ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 13
1964

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 13 1964 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 5-18

LES LEVURES ALCOOLIQUES DANS LES VINS ; PROTÉOLYSE ET PROTÉOGENÈSE

Ch. POUX, C. FLANZY, M. FLANZY
avec la collaboration technique de Modeste CAILLET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Les auteurs étudient les évolutions de l'azote dans les vins au cours d'une protéolyse plus ou moins prolongée des levures de fermentation correspondantes.

Ils examinent aussi les variations de N total et en détail les variations des acides aminés.

I. — INTRODUCTION

Dans le cas de la technologie des boissons alcooliques, les levures sont considérées avant tout comme génératrices d'alcool éthylique. D'où la base de la systématique classique basée sur le métabolisme glucidique.

En technologie ce métabolisme ne pose pratiquement pas de problème. Les levures — quelles qu'elles soient — dans un milieu glucidique aussi particulier que le jus de raisin, donnent spontanément de l'alcool éthylique dans le rapport relativement constant de 17 g de sucre pour 8 g d'alcool.

Mais simultanément ces mêmes levures transforment le N ammoniacal existant ou ajouté en N organique depuis les molécules simples d'acides aminés jusqu'aux constituants protéiques de la cellule. En d'autres termes, elles constituent un instrument de transformation de N minéral inutilisable par l'homme en N organique assimilable.

En contre partie de cette fonction protéogénique, la protéolyse est un catabolisme, connu sans nul doute, mais dont les règles dans le vin sont loin d'être précisées.

En outre, dans le cas d'une boisson alcoolique, l'effet physiologique de l'alcool

paraît atténué par certains constituants parmi lesquels on compterait les matières tannoïdes et les acides aminés. Pure hypothèse d'ailleurs, car les études systématiques en la matière sont trop peu nombreuses.

Nous voici donc en présence de deux sources de N aminé dans les vins :

— une source exclusivement endogène par remaniement des acides aminés existant dans le moût au cours de la fermentation alcoolique et par autolyse des levures ou excrétion cellulaire ;

— et enfin, une source initialement exogène par addition de sel ammoniacal qui, par les voies de la protéogenèse et de la protéolyse, pourrait enrichir le milieu en acides aminés.

Certes, on a bien étudié — encore ces derniers temps — l'alimentation azotée de la levure et les conséquences d'une variation qualitative des sources d'azote (Lafon-Lafourcade-Peynaud, 1961 ; Lafon-Lafourcade, Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1962 ; Peynaud et Lafon-Lafourcade, 1962 ; Weiss, Rousset et Bonnet, 1959 ; Weiss, Rousset, Maillard et Bonnet, 1960). Mais, jusqu'à présent, tout au moins à notre connaissance, on n'a pas recherché d'une part, les conditions d'une autolyse intéressante d'autre part, comment le NH_3 exogène ajouté au jus de raisin marquait finalement le vin obtenu en constituants azotés.

Ce premier mémoire détaille des essais entrepris sur la protéolyse spontanée. Un deuxième mémoire relatera les essais de protéogenèse et de protéolyse consécutifs à des apports exogènes de NH_3.

II. — EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES

L'évolution des acides aminés dans les vins sous l'action de la protéolyse des levures a été suivie sur les vins blancs obtenus avec les raisins récoltés en 1961 et en 1962 au domaine de l'I. N. R. A. (Pech-Rouge, Narbonne).

Les raisins choisis étaient issus du cépage *Terret-Bourret* de *Vitis vinifera*. Ils étaient sains, de maturité normale. Le jus obtenu a été partagé en 4 essais d'égal volume de 10 litres, numérotés de 1 à 4 ; l'essai n° 1 étant l'essai témoin.

Chaque essai a été — dès la mise en bocal — levuré à raison de $1\text{-}10^6$ cellules de *S. ellipsoideus* au ml et mis en chambre de fermentation portée à la température de 25° C.

Les fermentations ont débuté simultanément ; les contrôles périodiques ont montré un parallélisme suffisant entre les 4 essais.

Dix jours après, les fermentations atteignaient le point asymptotique de la courbe de fermentation, la densité du vin était de 1 000 et la grande masse des levures était déposée sous forme de lie.

L'essai témoin a été aussitôt soutiré, c'est-à-dire que la lie a été séparée du vin.

Dans les trois autres essais, les bocaux correspondants ont été agités pour remettre en suspension le dépôt des levures.

Après un mois — marqué par deux agitations supplémentaires dans les mêmes conditions — à 10 jours d'intervalle chacune, on a soutiré l'essai 2.

Pour l'essai n° 3 on a procédé à trois autres agitations successives à 10 jours d'intervalle chacune. Après deux mois, comptés à partir du moment du soutirage de l'essai témoin, on a soutiré le vin.

Pour l'essai n° 4 on a procédé comme pour l'essai n° 3, mais, au lieu de soutirer, on a remis les lies en suspension. Cette opération a été suivie de deux nouvelles agitations à 10 jours d'intervalle.

On a ensuite soutiré un mois après le soutirage de l'essai n° 3.

La durée de contact vin-levures était donc la suivante à l'issue de tous les soutirages :

Essai n° 1 (témoin)..10 jours.
Essai n° 2.....1 mois 10 jours.
Essai n° 3.....2 mois 10 jours.
Essai n° 4.....3 mois 10 jours.

En 1962 les essais ont été répétés exactement dans les mêmes conditions.

Les vins obtenus ont été analysés simultanément après clarification spontanée. Et pour tenir compte de l'avance du témoin et successivement des essais 1, 2 et 3 par rapport à l'essai 4, les récipients ont été maintenus pleins, à la même température, jusqu'à ce que l'expérience n° 4 ait été terminée.

Les déterminations analytiques ont été les suivantes :

— sur le moût de 1962 : l'acidité, les sucres, N total, acides aminés ;

— sur les vins de tous les essais : degré alcoolique, acidité, N total, acides aminés.

Le sucre a été dosé par la méthode de G. BERTRAND.

Les acidités par la méthode officielle.

L'alcool éthylique (degré alcoolique) par la méthode M. FLANZY, L. BOUZIGUES, 1955.

Les acides aminés ont été dosés par les méthodes microbiologiques (ADRIAN, 1955, 1958, 1960; BLOCK et WEISS, 1956 ; LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1959).

III. — RÉSULTATS

Voici d'abord les résultats des dosages de N total, N organique et N ammoniacal.

TABLEAU I

N en mg/litre

Essais	N total	N ammoniacal	N organique
1961			
Moût	205	traces	205
Vin témoin	98	0	98
Vin 1 mois sur lie	157	0	157
Vin 2 mois sur lie	175	0	175
Vin 3 mois sur lie	171	0	171
1962			
Moût	196	8	188
Vin témoin	70	0	70
Vin 1 mois sur lie	91	0	91
Vin 2 mois sur lie	115,5	0	115,5
Vin 3 mois sur lie	122,5	5,6	116,9

Pendant la fermentation l'N ammoniacal disparaît entièrement, l'N organique accuse une perte importante (63 p. 100 en 1962, 53 p. 100 en 1961). Ceci ne fait que confirmer un fait biologique bien connu et qui s'explique par la protéogenèse qui transpose cet N dans l'ensemble protéique de la levure (cellule et constituants).

On constate que le séjour sur lie amène un enrichissement du vin en N organique. En 1962, après un mois il est de 30 p. 100 par rapport au vin témoin, après 2 mois

cette augmentation atteint 65 p. 100 soit environ le double. Après trois mois, elle ne dépasse pas 67 p. 100, mais on voit apparaître des traces de NH_3. En 1961, les augmentations ont été respectivement de 60 p. 100 après un mois et 78 p. 100 après 2 mois, après 3 mois on assiste aussi à une stabilisation de ce pourcentage mais avec libération de NH_3.

Cette augmentation est bien connue comme phénomène général. Mais ce qui est

Teneur en acides aminés

L'ensemble des résultats constitue les tableaux 2 et 2 *bis*.

TABLEAU 2

Acides aminés dans les vins de la récolte 1961 *en mg/l*

Acides aminés	Témoin	Sur lie		
		1 mois	2 mois	3 mois
Alanine	6	18,2	30,0	30,0
Arginine	2,4	5,7	9,6	8,7
Acide aspartique	5,3	24,0	44,0	38,0
Acide glutamique	21,0	50,0	101,0	95,0
Cystine	10,5	21,0	26,5	24,3
Glycocolle	13,6	20,0	26,5	23,5
Histidine	5,3	5,3	16,0	13,9
Isoleucine	12,0	22,0	32,0	32,0
Leucine	13,0	30,0	53,0	49,0
Lysine	3,2	15,8	42,8	35,3
Méthionine	0,96	4,7	10,8	10,7
Phénylalanine	28,0	29,0	36,0	36,0
Proline	103,0	160,0	182,0	110,0
Sérine	26,5	63,0	76,0	66,0
Thréonine	4,6	12,5	21,4	19,4
Tyrosine	5,0	18,6	30,0	25,7
Tryptophane	4,5	3,5	6,7	5,9
Valine	6,4	21,0	38,5	36,0
N aminé total en N mg/l	33,5	64,7	98,3	82,4

nouveau, c'est la détermination de la durée de la période de protéolyse. Ainsi après 2 mois, la dose N total n'augmente pas.

Il est à remarquer que la dose de N total est dans le vin le plus riche toujours inférieure au N moût. Cette perte mériterait d'être précisée. Elle ne le sera pas au cours de ces essais.

TABLEAU 2 *(bis)*

Acides aminés dans les vins de la récolte 1962 *en mg/l*

Acides aminés	Moût	Témoin	Sur lie		
			1 mois	2 mois	3 mois
Alanine		3,8	9,1	18,2	20,4
Arginine	114,0	2,3	3,5	5,7	6,7
Acide aspartique	7,6	4,0	10,0	23,0	26,0
Acide glutamique	60,0	21,0	46,0	93,0	59,0
Cystine	0,8	3,0	9,0	11,6	13,7
Glycocolle	7,1	10,4	18,4	26,3	28,3
Histidine	12,8	2,5	5,4	9,7	8,7
Isoleucine	8,8	5,4	10,6	19,3	22,6
Leucine	14,0	8,1	13,5	29,0	32,0
Lysine	4,4	4,7	10,0	24,2	29,3
Méthionine	0,7	1,5	3,8	8,6	9,2
Phénylalanine	28,0	4,3	10,1	22,4	26,7
Proline	216,0	180,0	176,0	216,0	214,0
Sérine	43,0	33,0	42,0	57,0	60,0
Thréonine		2,3	5,4	11,2	13,9
Tyrosine	7,5	4,3	9,5	17,1	18,8
Tryptophane	3,9	2,5	4,0	6,4	7,6
Valine	17,0	4,8	9,7	19,0	21,0
N aminé total en N mg/l	90,0	37,3	49,6	76,9	78,1

D'une façon très générale, on note une augmentation de la teneur en acides aminés par rapport au vin témoin. Elle suit approximativement l'augmentation de N total. Ceci sera examiné en détail au chapitre : « Discussion ».

Caractères analytiques et gustatifs

La détermination des acidités totales et volatiles et du degré alcoolique donnent les résultats suivants :

	1961			1962		
	A.T.	A.V.	Alcool	A.T.	A.V.	Alcool
	—	—	—	—	—	—
Témoin	3,85	0,38	11°60	3,30	0,27	11°80
1 mois	3,45	0,40	11°60	3,30	0,40	11°80
2 mois	3,95	0,32	11°80	3,30	0,34	11°85
3 mois	3,95	0,42	11°60	3,40	0,45	11°80

Dégustation.

Les vins des deux séries d'essais (1961 et 1962) présentent une couleur jaune dorée sans traces sensibles d'oxydation.

Leur bouquet, s'il est discret, n'en est pas moins fin.

Légèrement acides au palais, ils sont fruités et frais malgré leur richesse alcoolique.

Le séjour sur lies semble être bénéfique jusqu'au premier mois, où le vin acquiert une harmonie dans ses constituants plus grande que celle du témoin.

Passé ce laps de temps, les vins offrent des goûts de lie plus ou moins prononcés mais sont encore assez agréables.

En bref, les dégustations ont donné des résultats identiques pour les vins des deux années :

— le meilleur est le vin laissé un mois sur lie ;

— viennent après le témoin et ensuite les vins de deux et trois mois sur lies. Ce dernier étant le moins bien noté.

Pour les vins de 1961 les variations ne sont pas assez significatives pour discuter les résultats trouvés. Toutefois, l'essai n° 3 (2 mois, se remarquerait par une diminution de l'acidité volatile et une augmentation du degré alcoolique.

Pour les vins de 1962 on retrouve cette particularité de l'essai n° 3, mais plus atténué, surtout pour le degré alcoolique. Cette simultanéité est malgré tout assez troublante et mérite d'être vérifiée par des essais ultérieurs.

L'examen chromatographique montre la disparition du spot de l'acide malique dans tous les essais. Il faut donc en conclure que la fermentation malolactique était acquise dans l'essai témoin, par conséquent, que les autolysats réalisés après 1 mois, 2 mois et 3 mois de contact du vin avec la levure n'ont eu, par rapport au témoin aucun effet sur cette fermentation.

En rappelant que ces vins n'ont reçu aucune addition de SO_2 nous avons procédé aux deux déterminations suivantes : le comportement de ces vins au contact de l'air à la température ordinaire et à l'étuve à 28°C.

A *température ordinaire* on ne constate, quel que soit le vin, aucun phénomène de casse aussi bien enzymatique que physicochimique.

A l'étuve les échantillons des essais n° 1 et n° 2 ne présentent aucune évolution visible. Par contre, les échantillons des essais 3 et 4 se recouvrent d'un voile d'Acétobacters. On a là une indication extrêmement intéressante qui mérite d'être confirmée par des essais ultérieurs.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

On examinera successivement l'évolution globale des différentes formes d'azote dans la série mise en train en 1962 (N total, N ammoniacal, N aminé et N protéique et amidé par différence), puis l'évolution des différents acides aminés dans toutes les séries.

a) *Évolution de N*

En reprenant les données du tableau 1 (N total, N ammoniacal) et du tableau 2 *bis* (N aminé total par dosage microbiologique, compté en mg de N par litre), on a rassemblé dans le tableau 3 les données concernant l'évolution de l'azote d'une part, du moût au vin à la suite de la fermentation alcoolique d'autre part, du vin témoin à celui ayant subi un séjour de 2 mois sur lies.

TABLEAU 3

Évolution de N en mg/litre — Série 1962-1963

Essais en mg/l	Fermentation			Séjour sur lies	
	Moût	Vin témoin	Évolution de N	Vin après 2 mois sur lies	Évolution de N
N total	196	70	— 126	115,5	+ 45,5
N ammoniacal	8	0	— 8	0	0
N organique total	188	70	— 118	115,5	+ 45,5
N aminé (dosé par microbiologie)	90	37,3	— 52,7	76,9	+ 39,6
N protéique et amidé	98	32,7	— 65,3	38,6	+ 5,9

Les levures pendant la fermentation ont consommé tout l'N ammoniacal, une partie des acides aminés et des protéines du moût.

Au cours du séjour sur lie durant 2 mois, le vin s'est enrichi en azote sous l'effet de l'autolyse des levures. Cet enrichissement est surtout constitué par de l'azote aminé (87 p. 100) et dans une plus faible proportion par de l'azote protéique ou amidé (13 p. 100).

La durée du séjour sur lie la plus favorable à l'enrichissement du vin en N aminé a été, dans nos essais, de deux mois. Pendant le premier mois l'autolyse s'amorce mais est incomplète. Après deux mois elle oscille autour du maximum d'acides aminés libérés. Après un séjour de trois mois l'autolyse parait trop poussée et l'on constate une libération de NH_3 ; pour la série 1961-1962 on observe une légère perte de la teneur de la plupart des acides aminés ; pour la série 1962-1963 la perte n'affecte plus que la proline, l'histidine et l'acide glutamique.

b) *Évolution des acides aminés*

Consommation des acides aminés par la levure au cours de la fermentation.

Dans un milieu naturel comme le moût de raisin très pauvre en ammonium, la source d'azote la plus aisément utilisée est constituée par les amino-acides. Des résultats tirés du tableau 2 *bis*, on a pu déduire les pourcentages, de chaque acide aminé du moût, utilisés. Nous les avons comparés à ceux observés par BARTON-WRIGT et THORNE (1949) pour le moût de bière et par LAFOURCADE et PEYNAUD (1961) dans deux moûts de raisin de la région bordelaise.

TABLEAU 4

	En p. 100 de l'acide aminé consommé												
	Arginine	Phénylalanine	Histidine	Valine	Glutamique	Aspartique	Tyrosine	Leucine	Isoleucine	Tryptophane	Sérine	Proline	Lysine
PECH-ROUGE.....	98	84	80	72	65	47	43	42	38	35	23	16	0
BARTON, WRIGHT et THORNE....	94	94	85	93	83	92	93	93	91	99	82	14	85
LAFOURCADE, PEYNAUD N° 1..	84	—	—	100	—	—	—	67	100	0	—	22,8	—
LAFOURCADE, PEYNAUD N° 2..	81	—	—	100	—	—	—	—	100	—	—	31	—

Ces résultats, rassemblés dans le tableau 4 montrent des différences marquées dans l'utilisation des différents acides aminés par les différentes races de levures utilisées.

De plus, si l'on compare le pourcentage de consommation de chaque acide aminé, par rapport à la consommation globale de ces acides aminés, nous arrivons aux résultats suivants. (Tableau 5)

Nous retrouvons bien le caractère général des levures qui est la grande consommation d'arginine, mais nous ne retrouvons pas ici la faible consommation de proline constatée pour le moût de bière.

Pour l'ensemble des autres acides aminés, on voit que leur consommation semble assez variable selon les deux variétés de levures et peut être aussi de milieu. De plus, on peut constater que certains acides aminés ont été restitués au vin avec une teneur plus élevée que celle qu'ils avaient dans le moût (cystine, glycocolle, lysine, méthionine).

TABLEAU 5

	Micromolécules consommées	P. 100 consommé par rapport à la consommation totale	
		Levure de bière (1)	Levure de vin (2)
Alanine			
Arginine	— 641	35,0	36,5
Acide aspartique	— 27	3,2	1,5
Acide glutamique	— 265	5,2	15,1
Cystine	+ 9	0,5	
Glycocolle	+ 45		
Histidine	— 66	4,9	3,7
Isoleucine	— 26	4,3	1,4
Leucine	— 45	7	2,5
Lysine	+ 2	9,4	
Méthionine	+ 6	1,3	
Phénylalanine	— 143	2,8	8,1
Proline	— 313	3,8	17,8
Sérine	— 96	3,7	5,4
Thréonine			
Tyrosine	— 18	2,8	1,0
Tryptophane	— 7	2,8	0,4
Valine	— 105	7,9	5,9
Total	1 752		

(1) Barton-Wright et Thorne (1949).
(2) *Terret*, 1962.

Enrichissement du vin en acides aminés.

Si nous considérons le rapport : $\frac{\text{Teneur en acides animés « essai »}}{\text{Teneur en acides aminés « témoin »}}$ pour chacun des acides on peut établir le tableau 6 :

L'augmentation est générale, mais tous les acides aminés n'augmentent pas de façon identique. Au bout de deux mois de séjour sur lie les uns, peu nombreux,

TABLEAU 6

Variation proportionnelle de la dose d'acides aminés

	1961-1962				1962-1963			
	Témoin	1 mois sur lie	2 mois sur lie	3 mois sur lie	Témoin	1 mois sur lie	2 mois sur lie	3 mois sur lie
Alanine	1	3,0	5,0	5,0	1	2,39	4,7	5,3
Arginine	1	2,3	4,0	3,6	1	1,5	2,4	2,9
Acide aspartique	1	4,5	8,3	7,1	1	2,5	5,7	6,5
Acide glutamique	1	2,3	4,8	4,5	1	2,1	4,4	2,8
Cystine	1	2,0	2,5	2,3	1	3,0	3,8	4,5
Glycocolle	1	1,4	1,9	1,7	1	1,7	2,5	2,7
Histidine	1	1,0	3,0	2,6	1	2,1	3,8	3,4
Isoleucine	1	1,8	2,6	2,6	1	1,9	3,5	4,1
Leucine	1	2,3	4,0	3,7	1	2,5	3,5	3,9
Lysine	1	4,9	13,3	11,0	1	2,1	5,1	6,2
Méthionine	1	4,8	11,2	11,1	1	2,5	5,7	6,1
Phénylalanine	1	1,03	1,2	1,2	1	2,3	5,2	6,2
Proline	1	1,5	1,7	1,06	1	1,0	1,2	1,1
Sérine	1	2,3	2,8	2,4	1	1,2	1,7	1,8
Thréonine	1	2,7	4,6	4,2	1	2,3	4,8	6,04
Tyrosine	1	3,7	6,0	5,1	1	2,2	3,9	4,3
Tryptophane	1	1,0	1,4	1,3	1	1,6	2,5	3,0
Valine	1	3,2	6,0	5,6	1	2,0	3,9	4,3

voient leur teneur augmenter de 1 à 2 fois seulement tandis que les plus nombreux — 11 en 1961 et 16 en 1962 — voient leur teneur augmenter de 2 à 6 fois.

C'est là une augmentation très importante qui tend à restituer au vin une grande partie des pertes en acides aminés qu'il a subies au cours de la fermentation.

Notons que le coefficient d'augmentation n'est pas le même chaque année pour chacun des acides aminés dosés, lorsque les résultats sont exprimés en mg d'acides aminés par litre. Ceci peut aisément s'expliquer si l'on suppose que la masse de levures qui a subi l'autolyse n'est pas identique d'une année à l'autre.

Mais exprimons les résultats en micromolécules. On constitue le tableau 7 :

Il apparaît nettement que les pourcentages d'accroissement de chaque acide aminé par rapport à l'accroissement total en acides aminés sont très voisins d'une année à l'autre, pour la grande majorité des acides aminés, sauf trois marqués d'un astérisque : l'acide glutamique, le glycocolle et la phénylalanine.

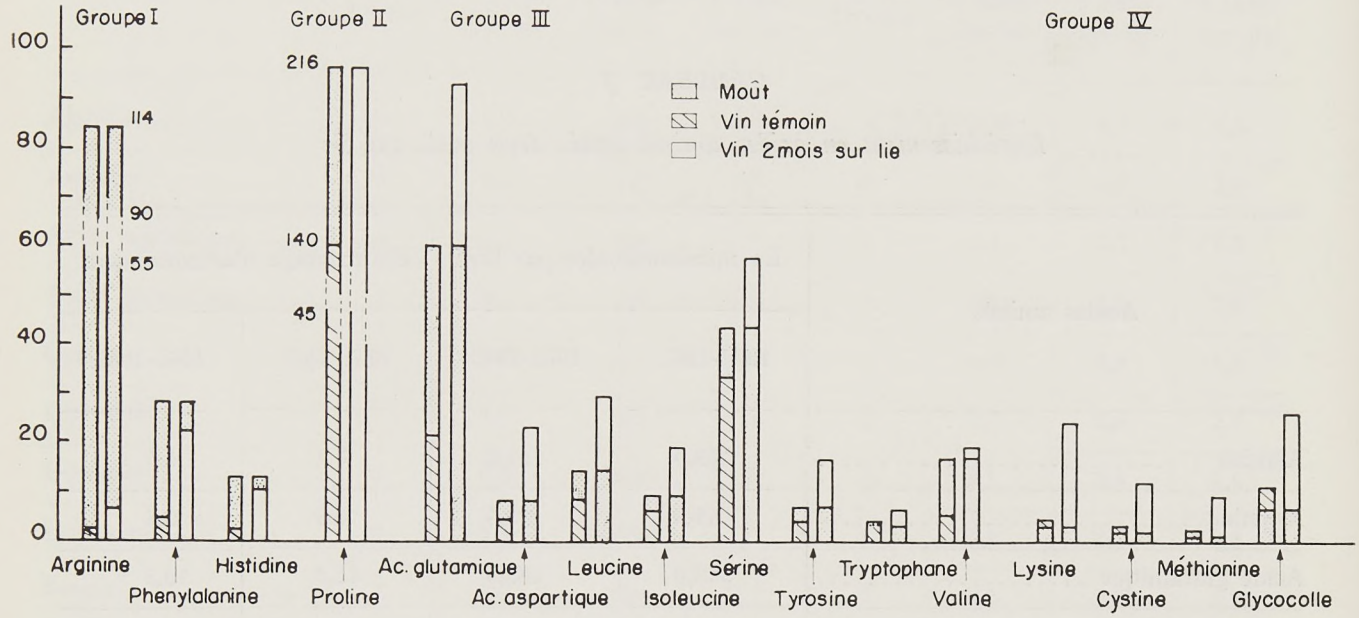
Ceci permet de penser que l'on est bien en présence de l'hydrolyse d'une protéine (ou d'un édifice protidique). Ces protéines provenant des levures qui ont assuré la fermentation ont une grande probabilité d'être les mêmes les deux années, car les moûts ont été ensemencés avec la même souche.

TABLEAU 7

Enrichissement en acides aminés après deux mois sur lie

Acides aminés	En micromolécules par litre		Pourcentage d'accroissement	
	1961-1962	1962-1963	1961-1962	1962-1963
Alanine	269,0	161,0	6,1	6,5
Arginine	41,3	19,5	0,9	0,8
Acide glutamique	543,0	489,0	12,3	19,9 *
Acide aspartique	290,7	142,7	6,6	5,8
Cystine	66,5	35,7	1,5	1,4
Glycocolle	171,8	211,8	3,9	8,6 *
Histidine	68,9	46,4	1,5	1,8
Isoleucine	152,0	122,0	3,4	4,9
Leucine	304,9	159,0	6,9	6,4
Lysine	270,8	133,0	6,1	5,4
Méthionine	6,5	4,7	0,1	0,1
Phénylalanine	484,0	103,0	11,0	4,1 *
Proline	686,0	312,6	15,5	12,7
Sérine	470,9	228,0	10,7	9,2
Thréonine	141,0	74,7	3,2	3,0
Tyrosine	137,9	70,6	3,1	2,8
Tryptophane	10,7	19,0	0,2	0,7
Valine	274,0	121,0	6,2	4,9
Total (en micromolécules)	3 704,6	2 453,0		

Nous avons vu que globalement cette autolyse de levures contenues dans les lies tendait à restituer au vin 75 p. 100 des acides aminés qui avaient été prélevés au moût au cours de la fermentation. Cependant, en raison de ce que ces acides aminés ont participé d'abord à une synthèse protidique (élaboration des levures), puis à une protéolyse, cette dernière ne provenant pas uniquement de la destruction des protéines élaborées exclusivement avec ces acides aminés, mais aussi du métabolisme propre à la levure, il était intéressant de se demander quelle était la propor-



tion des différents acides aminés qui étaient restitués, et avoir ainsi une idée du remaniement opéré à la suite de tous ces processus de protéolyse et protéosynthèse.

Nous avons ainsi classé les acides aminés en 4 groupes :

Groupe I. — Les acides aminés du moût qui, consommés pendant la fermentation, ne sont pas restitués au vin au cours de l'autolyse.

Ce sont : l'arginine, la phénylalanine, l'histidine.

Groupe II. — Les acides aminés du moût, consommés pendant la fermentation, qui sont restitués à peu près exactement.

C'est la proline.

Groupe III. — Les acides aminés qui, consommés pendant la fermentation, sont restitués dans le vin avec une teneur plus grande qu'ils n'avaient dans le moût.

C'est le groupe le plus nombreux qui comprend : l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine, l'isoleucine, la valine, la sérine, la lysine, le tyrosine et le tryptophane.

Groupe IV. — Les acides aminés dont la teneur va en croissant d'abord durant la fermentation, puis à la suite de l'autolyse. Ce sont, en particulier, les deux acides aminés soufrés : la cystine et la méthionine et le glycocolle.

Le graphique 1 donne une image de l'évolution des acides aminés du moût au vin et après le séjour sur lies, en les classant selon les 4 groupes.

L'évolution des acides aminés du moût au vin au cours de la fermentation, puis après autolyse plus ou moins prolongée sur lies, telle que nous l'avons envisagée ici et avec les méthodes de dosage utilisées, n'est qu'une contribution à l'étude d'un

problème très complexe touchant aux transpositions et à l'évolution des produits azotés dans le vin, dont l'importance a déjà été maintes fois signalée en œnologie. Ce travail nous permet d'entrevoir un certain nombre de facteurs qui tendent à faire varier la constitution des vins et, en particulier, leur teneur en acides aminés.

En effet, la teneur des moûts en acides aminés varie en fonction des cépages et pour un même cépage en fonction de l'année. Les différentes races de levures par une assimilation différentielle des différents acides aminés vont imprimer au vin fait un nouvel équilibre de ceux-ci après la fermentation. Enfin, l'autolyse des levures libère dans le vin fait, selon la durée du séjour sur lies, des quantités variables d'acides aminés, en relation avec la constitution de leurs édifices protidiques propres.

Tous ces facteurs permettent de rendre compte de la grande variabilité de la teneur en acides aminés des vins. Leur étude, certes difficile et encore à ses débuts, doit tout de même permettre, par une meilleure connaissance de ces phénomènes, de préciser de mieux en mieux, certaines techniques de vinifications.

Reçu pour publication en novembre 1963.

SUMMARY

ALCOHOL YEASTS IN WINES ; PROTEOLYSIS AND PROTEOGENESIS

When yeast and wine were left together for a more or less prolonged period, the N content of the latter increased, without however reaching the amount present in the original must.

Under the conditions of the experiment this N enrichment reached its maximum between the 1st and 2nd month.

During this process there was a heavy increase in some amino acids and in particular glycine and the sulphur group, cystine and methionine, and a disappearance of others, notably arginine, phenylalanine and histidine.

From the point of view of the technology of wine making and within certain well defined time limits, an improvement in the flavour of the wine was obtained.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADRIAN S., 1955. Nouvelle technique pour le dosage microbiologique simultané des acides aminés indispensables et conditions de leur extraction en présence de glucides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 107-121.

ADRIAN S., RÉRAT A., 1958. Méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines. *Ann. Nutr. Alim.*, **12**, 1-94.

ADRIAN S., 1960. Le dosage des acides aminés par voie microbiologique. *Aminoacides, peptides, protéines*, n° 4, 121-140.

BARTON WRIGTH et THORNE, 1949. *J. Inst. Brewing*, **55**, 383, (dans « The Chemistry and Biology of yeast par COOK H., 1958. Academic Press Inc.).

BLOCK R., WEISS K., 1956. *Aminoacid Handbook*, 450-470.

BOURDET A., HERARD J., 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Techn. agric.*, **2**, 177-202.

FLANZY M., BOUZIGUES L., BOUZIGUES H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfo-chromique. *Ann. Techn. agric.*, **4**, 397-415.

GENEVOIS L., 1957. Oxyaminoacides. *Traité de Chimie Biologique*, **1**, 5.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1959. Dosage microbiologique des acides aminés des moûts et des vins. *Vitis*, Mars, 45-56.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 143-160.

LAFOURCADE S., RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1962. Constitution des protides des levures en fonction de leur alimentation azotée. *C. R. Ac. Sc.*, **254**, 1688-1690.

LAFOURCADE S., 1962. Constitution des protides des levures en fonction des carences vitaminiques du milieu de culture. *C. R. Ac. Sc.*, 255, 3266-3268.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., 1962. Sur la nutrition azotée des levures de vin. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **17**, 11-21.

SHUPHAN, WEINMANN, 1960. La pomme de terre, source de protéine de haute qualité, d'après les résultats d'essais de nutrition et d'après l'analyse des aminoacides constituants. *Ann. Nutr. Alim.*, **14**, 177.

WEISS H., ROUSSET A., BONNET R., 1959. L'évolution des différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Ac. Sc.*, **249**, 1796.

WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M. T., BONNET R., 1960. L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant des cépages d'Alsace. *C. R. Ac. Sc.*, **250**, 1322.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 19-29

ÉTUDE DES EFFETS DE LA FERTILISATION BORATÉE DES VIGNES CARENCÉES EN BORE SUR LA VINIFICATION ET SUR LA COMPOSITION MINÉRALE DES VINS

J. DECAU et Marie LAMAZOU-BETBEDER

avec la collaboration technique de A. PACE

Station d'Agronomie et d'Œnologie, Toulouse (Haute-Garonne)

SOMMAIRE

La carence en bore et la fertilisation boratée de vignes carencées n'agissent pas sur l'activité des levures au cours de la fermentation des moûts.

La fertilisation boratée augmente la teneur en bore des vins, mais entraîne un abaissement des teneurs en les principaux autres éléments minéraux. Les causes des différences observées sont recherchées dans les effets de la fertilisation boratée sur la constitution physique des baies, sur le rendement de la Vigne et sur la maturation des raisins.

INTRODUCTION

A la suite de différentes observations de carence en bore de la Vigne dans la Région toulousaine (DECAU, 1960, 1962) des essais de fertilisation en cet oligo-élément ont été entrepris par l'un de nous en 1962 sur plusieurs vignes dans lesquelles se sont manifestés les symptômes de déficience.

Après avoir étudié les conséquences de cette carence et l'effet de la fertilisation boratée sur les rendements (travaux non encore publiés) nous avons recherché les suites possibles de la carence et de l'apport de bore d'une part sur la vitesse de fermentation des moûts, d'autre part sur la composition minérale des vins obtenus.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

A) Matériel utilisé et techniques de vinification

Pour l'expérimentation, trois vignes ont été choisies, qui sont situées dans les cantons de Cazères-sur-Garonne et de l'Isle-en-Dodon, au sud de Toulouse, et plantées en *SV 18315*, cépage assez fréquemment carencé en bore dans cette région.

Sur ces vignes, qui présentaient en 1961 des symptômes de carence, des essais de redressement de la production par apport de borate concentré ont été entrepris en 1962 : la fertilisation boratéé a été appliquée au sol au cours de l'hiver précédant les prélèvements utilisés dans cette étude ; la dose de bore apportée a été de 8, 5 kilogrammes par hectare.

Dans chaque vigne, des raisins ont été prélevés, d'une part dans les parcelles carencées, d'autre part dans les parcelles fertilisées, à partir desquels deux types de vinification ont été réalisés d'après une technique connue (FLANZY et POUX, 1958).

Vinification en rouge : des lots de raisins provenant de deux des vignes étudiées (vignes 2 et 3 des tableaux ci-dessous) ont été égrappés et foulés à la main puis mis à fermenter dans des flacons de verre placés et maintenus pendant la durée de la vinification à la température du laboratoire.

Vinification en blanc : à partir de lots de raisins provenant des vignes précédentes — ainsi que des deux parcelles de la vigne 1 — le moût seul, obtenu après foulage à la main, a été mis à fermenter dans les mêmes conditions.

La température et les teneurs en sucres restants ont été notées chaque jour dans les différents essais pendant la durée de la fermentation. Puis les vins obtenus ont fait l'objet d'une analyse comportant la détermination du bore, de l'azote, du calcium, du potassium, du sodium, du magnésium, du phosphore et du fer.

B) Techniques analytiques

Dosage du bore.

Cinq millilitres de vin ont été placés dans une capsule de platine au contact de 20 millilitres d'eau de chaux, volume suffisant pour amener le liquide à pH nettement alcalin ; la solution a été ensuite évaporée puis l'extrait sec obtenu calciné à température légèrement inférieure à 500°C jusqu'à obtention de cendres blanches.

Les cendres ont été reprises au moyen d'une solution d'acide acétique à 25 p. 100 : après centrifugation du liquide, le dosage du bore a été réalisé sur une partie aliquote du surnageant par colorimétrie au moyen du 1,1′ dianthrimide suivant la méthode de GORFINKIEL et POLLARD (1954).

Dosage de l'azote total.

La teneur en azote total a été déterminée suivant la méthode Kjeldahl, telle qu'elle est décrite par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1958).

Dosage du calcium, du potassium, du sodium, du magnésium, du phosphore et du fer.

La prise de vin (20 ml) a été placée dans une capsule de platine, évaporée puis calcinée à 500-550° jusqu'à obtention de cendres blanches.

Après reprise des cendres par 4 millilitres d'acide chlorhydrique à 10 p. 100, le liquide, après filtration, a été amené à 20 millilitres.

Une partie aliquote de la solution ainsi obtenue a été prélevée pour le dosage du calcium par photométrie de flamme.

Une autre partie a été utilisée, après dilution, pour les dosages du potassium et du sodium par photométrie de flamme, et pour les déterminations colorimétriques du magnésium par formation de la laque au jaune de titane (CARLES, 1957), du phosphore par formation du phosphovanadomolybdate (CHARLOT, 1961) et du fer avec l'orthophénantroline suivant la méthode de DEIBNER et BOUZIGUES(1952).

Remarques.

Nous avons recherché les interférences possibles, dans nos conditions expérimentales, du calcium et du potassium sur la détermination du sodium par photométrie de flamme et celles du potassium, du sodium et du phosphore dans le dosage du calcium.

Les interférences du calcium et du potassium dans la détermination du sodium sont très faibles et négligeables. En revanche, celles du potassium et du sodium et, particulièrement, du phosphore dans le dosage du calcium sont plus importantes ; il en a été tenu compte dans la détermination de ce dernier élément.

Enfin, nous avons vérifié l'absence de pertes de phosphore à la calcination par le dosage comparé de cet élément dans la prise de vin calcinée d'une part sans addition d'acétate de chaux d'autre part après addition d'acétate de chaux.

RÉSULTATS

Influence de la fertilisation boratée sur la vitesse de fermentation

On pouvait *a priori* craindre que la carence en bore de la Vigne ne conduisît à des moûts pauvres en cet oligo-élément indispensable à la vie végétale et que ce dernier, de ce fait, ne limitât la vitesse de vinification. En fait, il semble que, malgré la carence, les besoins en bore des levures puissent être largement satisfaits par la dose contenue dans le raisin, car les vitesses de fermentation ne sont pas réduites dans le moût provenant de parcelles carencées comme le montrent les résultats inscrits sur le tableau 1.

TABLEAU 1

Vigne	2		3	
Parcelle	C	F	C	F
Mode de vinification	en rouge	en rouge	en blanc	en blanc
Quantité moyenne de glucides (g/l) transformés par jour	15,1	15,3	13,5	13,6

C = carencée.
F = fertilisée.

TABLEAU 2

Vigne	1			1		
Parcelle	C			F		
Mode de vinification	en blanc			en blanc		
Quantité de bore apportée avant vinification (mg/l).....	0	1,25	6,25	0	1,25	6,25
Vitesse journalière moyenne de transformation des glucides (g/l).....	19,7	19,7	19,5	19,4	19,2	19,2

Au cours d'expériences complémentaires, nous avons observé que des apports de bore aux doses de 1,25 et 6,25 mg/l sous forme d'acide borique dans le moût, avant fermentation, n'ont pas modifié la vitesse de vinification (tabl. 2) ce qui vient ainsi confirmer que, dans nos conditions expérimentales, la carence en bore de la Vigne n'affecte pas le comportement des levures alcooliques au cours de la vinification.

Effets de l'apport de bore sur la composition minérale des vins

1) *Action sur la teneur en bore*

La fertilisation boratée a très nettement fait augmenter la teneur en bore des vins étudiés, résultat en accord avec ceux obtenus sur des vins de la région méditerranéenne par Jaulmes, Brun-Cordier et Bascou (1960). Pour deux vins rouges, par exemple, la teneur en bore, très inférieure à 1 milligramme par litre dans les vins des parcelles témoins, approche ou atteint 2 milligrammes dans les vins provenant des parcelles traitées ainsi que l'indiquent les résultats du tableau 3.

TABLEAU 3

Vigne		2		3	
Parcelle		C	F	C	F
B mg/l	Vinification en rouge	0,93	2,06	0,50	1,90
	Vinification en blanc.....	0,59	1,60	0,31	1,08

Cet enrichissement en bore des vins à la suite de la fertilisation boratée résulte de l'augmentation générale de la teneur en cet élément des différents organes de la Vigne. C'est ainsi que la teneur en bore des feuilles des vignes d'où sont issus les vins examinés s'est accrue dans de fortes proportions grâce à la fertilisation boratée comme le montrent les analyses qui figurent dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Vigne	2		3	
Parcelle	C	F	C	F
Teneur en bore des feuilles (p.p.m./MS)..	17,6	31,0	15,4	27,1

L'action de la fertilisation boratée sur l'enrichissement en bore du vin apparaît plus nettement encore sur les vins vinifiés en blanc.

Par ailleurs, la détermination du bore dans ces derniers fait apparaître des teneurs systématiquement inférieures de 30 à 50 p. 100 à celles observées dans les vins rouges.

Des essais complémentaires entrepris sur deux vignes bien alimentées en bore à la suite de l'apport au sol, il y a quelques années, d'une très importante fertilisation boratée ont donné les résultats suivants qui confirment notre précédente observation :

TABLEAU 5

Vigne		4	5
B mg/l	Vinification en rouge.....	2,30	2,60
	Vinification en blanc	1,62	1,63

Ceci montre donc que les rafles, pépins et pellicules macérant dans les moûts pendant la fermentation fournissent une quantité importante du bore trouvé dans les vins rouges.

Remarquons en outre que les teneurs en bore que nous avons notées paraissent assez faibles, si on les compare à celles indiquées par différents auteurs. C'est ainsi que JAULMES, BRUN-CORDIER et BASCOU (1958) ont trouvé des teneurs naturelles des vins en bore variant de 0,87 à 7,00 mg par litre, la plupart des échantillons étant situés entre 2,65 et 5,25 mg par litre. Dans une étude ultérieure, ces mêmes auteurs ont trouvé des teneurs de 0,46 mg à 3,90 mg par litre pour les vins d'Alsace, de 0,80 mg à 5,68 mg par litre pour les « Anjou », de 2,40 à 5,40 pour les vins de Bourgogne ; les extrêmes atteignent 0,89 et 6,64 pour les vins de nature Champagne ; enfin les vins rouges du Midi renferment des quantités de bore variant de 2,40 mg à 6,60 mg (JAULMES, BRUN-CORDIER et BASCOU, 1960). D'autres investigations dues à des chercheurs italiens ont donné des teneurs allant de 3,00 à 11,98 mg par litre pour les vins de Pavie (BIONDA, 1957) et de 3,40 à 5, 11 mg pour ceux de Ligurie (BIONDA et CIURLO, 1959).

Les teneurs en bore peu élevées que nous avons trouvées à la fois dans les vins provenant des parcelles témoins et dans ceux issus de parcelles fertilisées doivent provenir de la faible aptitude du *S V 18315* cultivé non greffé à utiliser le bore assimilable du sol, ce qui expliquerait la sensibilité bien connue de ce cépage à cette carence (BRANAS et BERNON, 1956).

Si nous comparons, d'après les résultats obtenus, les quantités de bore trouvées dans les vins provenant de parcelles fertilisées à celles des vins témoins, nous constatons que l'augmentation de la teneur obtenue grâce à la fertilisation boratée, très élevée en valeur relative, l'est certes beaucoup moins en valeur absolue. En effet, la teneur en bore des vins qui était en moyenne de 0,58 mg par litre pour les témoins a augmenté seulement de 1,08 mg par litre grâce à la fertilisation boratée.

L'enrichissement des vins en bore ne saurait entraîner d'effet toxique pour les

levures puisque celui-ci n'apparaît que pour la dose de 35 mg environ par litre (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1960), dose considérablement plus élevée que celle trouvée dans les vins issus de parcelles ayant reçu une fertilisation boratée. La détermination de la teneur des vins en bore vient donc confirmer l'absence d'effet toxique de cet élément sur les levures, absence d'effet toxique déjà observée par la comparaison des vitesses de fermentation des moûts provenant des parcelles fertilisées et des moûts des parcelles carencées.

2) *Action de la fertilisation boratée sur la teneur des vins en divers autres éléments minéraux*

La fertilisation boratée qui a fait varier, comme on vient de le voir, la teneur en bore des vins a-t-elle entraîné d'autres modifications de leur composition minérale ?

Les résultats donnés dans le tableau 6 font apparaître d'importantes différences à ce dernier point de vue.

TABLEAU 6

Vigne	Parcelle	Teneur en éléments minéraux (1)						
		N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe
2	C	0,08	0,32	1,41	0,07	0,11	0,040	2,8
	F	0,07	0,05	1,06	0,09	0,08	0,039	2,2
3	C	0,12	0,40	0,99	0,07	0,13	0,036	2,7
	F	0,10	0,22	0,76	0,10	0,11	0,040	2,3

(1) Les teneurs sont exprimées en grammes par litre excepté dans le cas du fer où les chiffres expriment des milligrammes par litre.

Si les teneurs en sodium sont très voisines dans les deux cas, les doses de calcium d'azote, de potassium, de magnésium, de fer et de phosphore diffèrent nettement Le calcium est plus abondant dans les vins provenant des parcelles fertilisées tandis qu'on note une quantité plus faible pour les autres éléments lorsque la vigne a reçu une fertilisation boratée ; le cas le plus remarquable dans ce sens est celui de l'acide phosphorique.

L'analyse d'un nombre plus important de vins confirme dans l'ensemble les résultats précédents ; la teneur en sodium paraît être indépendante de la fertilisation boratée, mais le calcium augmente dans les vins issus des parcelles fertilisées tandis que potassium, magnésium, fer et phosphore, sont toujours moins importants. En revanche, il ressort des analyses supplémentaires qu'il n'existe pas de différence systématique entre les teneurs en azote des vins provenant de vignes carencées ou de vignes normalement alimentées en bore.

DISCUSSION

Afin d'expliquer l'action de la fertilisation boratée sur l'abaissement de la teneur des vins en la plupart des éléments minéraux nous allons analyser les effets de l'apport de borate sur les vignes carencées.

La fertilisation boratée a permis la croissance normale des baies, tandis que, dans les parcelles carencées, le développement de celles-ci s'est trouvé entravé. Il en résulte une constitution physique des grappes différente dans les deux cas, constitution physique dont on connaît l'importance (Flanzy, 1955). La proportion de pellicules et de pépins est plus forte dans les raisins « carencés » (tabl. 7) Or, on sait que la macération de certaines parties solides de la grappe avec le moût entraîne un enrichissement du vin en matières minérales, particulièrement en acide phosphorique (Ventre, 1910).

TABLEAU 7

Vigne	1		2		3	
Parcelle	C	F	C	F	C	F
Pellicules et pépins %	8,6	7,4	9,3	8,2	9,5	8,7
Pulpe %	91,4	92,6	90,7	91,8	90,5	91,3
$\frac{\text{Pulpe}}{\text{Matières solides de la baie}}$	10,6	12,5	9,7	11,1	9,5	10,5

On pouvait donc penser que la présence d'une plus forte proportion de pellicules et de pépins dans le cas de raisins provenant de parcelles carencées pourrait, dans une certaine mesure, être à l'origine de la plus grande concentration en matières minérales dans les vins issus de tels raisins.

La contribution des pellicules et des pépins à l'enrichissement en matières minérales est illustrée dans le cas du phosphore — élément dont les variations sont particulièrement importantes pris pour cela, dans ce qui suit, comme élément-type — par la comparaison des teneurs des vins rouges et des produits vinifiés en blancs, issus des mêmes parcelles. Les teneurs des vins provenant uniquement de la fermentation des jus sont en effet systématiquement inférieures à celles trouvées dans les vins rouges dont la vinification comporte une macération avec pellicules et pépins (tabl. 8).

Mais le rapport $\frac{\text{Pulpe}}{\text{Pellicules} + \text{Pépins}}$, caractérisant la constitution physique des baies, différent dans les deux cas, ne saurait expliquer les différences de teneur en

TABLEAU 8

Vigne	Teneur des vins en phosphore (mg/l)					
	1		2		3	
Parcelle	C	F	C	F	C	F
Vinification en blanc	0,23	0,07	0,26	0,07	0,28	0,41
Vinification en rouge			0,32	0,08	0,40	0,22

phosphore observées puisque celles-ci sont également notées après vinification en blanc ainsi que le montrent les résultats du tableau ci-dessus.

D'autre part, pour interpréter les écarts entre les quantités d'acide phosphorique trouvées dans les vins pauvres en bore et dans ceux qui en sont normalement pourvus, il faut considérer l'effet de l'apport de borate sur le rendement des vignes carencées. En effet, un redressement tout à fait remarquable a été enregistré grâce à ce traitement ainsi que le montrent les résultats ci-dessous :

TABLEAU 9

Vigne	1	2	3
Augmentation du rendement (%)	42	233	142

L'application de borate a permis, en même temps qu'une fructification beaucoup plus abondante, une meilleure croissance de l'appareil végétatif de la Vigne. Les matières minérales se sont trouvées plus diluées dans tous les organes de la plante à la suite de l'emploi de la fumure boratée. Cette hypothèse s'est trouvée vérifiée, pour les feuilles des vignes étudiées, notamment par la détermination de leur teneur en acide phosphorique (tabl. 10).

TABLEAU 10

Vigne	1		2		3	
Parcelle	C	F	C	F	C	F
Teneur des feuilles en P (% de matière sèche)	0,11	0,08	0,12	0,11	0,18	0,15

La diminution de la teneur en phosphore est, comme on le voit, beaucoup moindre dans les feuilles que dans les vins. Il est probable que ceci provient essentiellement de l'effet très différent de la fertilisation boratée sur les organes végétatifs de la vigne et sur les organes de fructification. La masse des tissus sous formes de tiges et de feuilles s'est en effet moins accrue que la fructification par l'apport de borate et donc l'alimentation en phosphore des feuilles n'a été que faiblement modifiée ; par contre, l'approvisionnement en phosphore des raisins, très nettement plus abondants, grâce à la fertilisation boratée, a dû se faire de façon beaucoup plus difficile, d'autant plus difficile que les sols portant nos vignes expérimentales sont pauvres en cet élément.

Un autre facteur, très important, intervient de façon certaine dans la composition minérale des vins issus de raisins provenant des parcelles ayant reçu un apport de bore et des parcelles témoins. Les fruits cueillis en même temps, bien que n'ayant généralement pas atteint la maturité industrielle, se situent en un point différent par rapport à cette dernière : ceux qui sont issus de parcelles carencées s'en rapprochent sensiblement alors que les raisins « fertilisés » s'en éloignent davantage. Les chiffres ci-dessous (tabl. II) le montrent nettement.

TABLEAU II

Vigne	1		2		3	
Parcelle	C	F	C	F	C	F
Acidité (meq/l)	—	—	103	116	140	160
Glucides (g/l)	138,1	116,8	204,1	138,0	172,4	142,4

Les vignes fertilisées ont donné des raisins moins mûrs (moins de glucides et davantage d'acides) ; les baies des parcelles carencées ont plus de sucre que les précédents et moins d'acidité ; les chiffres donnés les situent plus avant dans le cycle de la maturation.

D'autres tests pris dans la composition minérale appuient cette affirmation : la baie s'enrichissant en phosphore au cours de la maturation (Ventre, 1910) il est normal qu'un raisin moins mûr (vigne fertilisée) soit moins riche en phosphore et par suite donne un vin de plus faible teneur en cet élément qu'un raisin plus mûr (vigne carencée) ce qui se vérifie ici. De même, considérant la teneur en calcium, nous constatons qu'elle est plus faible dans les vins provenant de raisins de parcelles carencées, autre indice d'une maturité plus avancée (Flanzy, 1937).

CONCLUSION

Notre étude a montré que l'activité fermentaire des levures dans la vinification, n'est pas influencée par un milieu pauvre en bore (moûts carencés) ni par l'enrichissement modéré des jus en bore (moûts provenant de parcelles fertilisées) ni par une

faible addition de bore avant fermentation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par AGULHON (1910) dans des conditions expérimentales différentes.

Ce travail a permis de constater que la fertilisation boratée de la Vigne, telle qu'elle est recommandée par la Recherche et la Vulgarisation et pratiquée par les viticulteurs, modifie assez peu, en valeur absolue, la teneur en bore des vins, celle-ci demeurant fort éloignée des doses « toxiques » pour les levures.

Nos recherches ont essayé de montrer, dans le cas des vignes carencées et dans celui des vignes fertilisées, combien la composition minérale d'un vin est liée aux conditions d'alimentation de la vigne : nous avons établi que l'effet de dilution qui en provient, de même que la maturité des baies, plus ou moins avancée selon le cas, permettent d'expliquer dans une large mesure, les différences de composition des vins issus de parcelles carencées en bore ou ayant reçu une fertilisation boratée.

Reçu pour publication en novembre 1963.

SUMMARY

THE EFFECT OF BORATED FERTILIZING ON THE PRODUCTION AND MINERAL COMPOSITION OF WINE FROM BORON-DEFICIENT VINES

A study of the effect of borated fertilizers on the vinting of must and on the mineral composition of wine from boron-deficient vines.

The speed of fermentation, as measured by the amount of sugar transformed daily per litre, was not influenced by a deficiency of boron in the plant, nor was it changed by the addition of small quantities of borate as a fertilizer, or of boric acid directly to the must.

The analysis of wine boron content revealed important differences in relative values between wines from boron-deficient and boron-fertilized vines : the quantity of boron in wine from boron-deficient plants (0.58 mg/l on average) was tripled in wine from vines fertilized with borate, but in both cases the amount of boron present was low in relation to yeast toxicity.

Borate fertilizing also reduced the amounts of most of the mineral constituents of the wine, and in particular that of phosphorus.

In seeking the reasons for this the authors had attempted to determine the precise action of borate on the physical constitution of the grape, the yield of the vine and the ripening of the fruit.

The notable increase in yield and the less matured condition of the fruit from borate fertilized as compared with boron-deficient vines harvested on the same date, seemed to be the chief causes of the difference in the mineral compositions of their respective wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGULHON H., 1910. *Recherche sur la présence et le rôle du bore chez les Végétaux*. Thèse, Paris, 63-70. Barnéoud et Cie, Laval.

BIONDA G., 1957. Contrôle de la teneur en bore des vins naturels de la province de Pavie. *Ann. Fals. Fr.*, **50**, 15-22.

BIONDA J., CIURLO R., 1959. Sur la teneur en bore de quelques vins de la Ligurie. *Ann. Fals. Fr.*, **52**, 369-372.

BRANAS J., BERNON G., 1956. La carence en bore dans les vignobles français. *Progr. Agr. Vit.*, **73**, 259-270, 388-394.

CARLES J., 1957. Microdosage colorimétrique du magnésium. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, n° 4, 445-452.

CHARLOT G., 1961. *Dosages colorimétriques des éléments minéraux*. 291-292, 2e éd., Masson et Cie, Paris

DECAU J., 1960. Premières observations de carence en bore sur les terrasses de la moyenne Garonne. *C. R. Acad. Agric.*, 1002-1008.

DECAU J., DUCOS R., PÉRODEAU J., PUJOL B., 1962. Nouvelles observations de carence en bore dans la région toulousaine, carence de la vigne en sols argileux et argilo-calcaires formés sur molasses miocènes. *C. R. Acad. Agric.*, 733-737.

DEIBNER L., BOUZIGUES H., 1952. Dosage électrophotocolorimétrique de traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Technol. Agric.*, 283-309.

FLANZY M., 1937. Maturation des raisins. *Rapport sommaire sur les travaux accomplis dans les Stations et Laboratoires de Recherches Agronomiques*, 44. Imprimerie Nationale. Paris.

FLANZY M., 1955. Caractéristiques de raisins : raisins à vin, raisins de table et raisins à jus de fruit. *Ann. Nutr. Alim.*, **9**, 5-6.

FLANZY M., POUX C., 1958. Les possibilités de microvinification. Application à l'étude de la macération. *Ann. Technol. Agric.*, 377-401.

GORFINKIEL E., POLLARD A. G., 1954. A modified procedure for determining boron in plant material and soils using 1.1′ dianthrimide. *J. Sci. Food Agric.*, **3**, 622-624.

JAULMES P., BRUN-CORDIER S., BASCOU P., 1958. La teneur naturelle des vins en acide borique. *Trav Soc. Pharm. Montpellier*, **18**, 133-6.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins.* 289-290, 2e éd., Ch. Béranger Paris et Liège.

VENTRE J., 1910. *Le phosphore dans les raisins et le vin.* Ses formes, 57-61, Coulet et Fils, Montpellier.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 31-43

INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LES RÉSULTATS DES MESURES DU POTENTIEL OXYDORÉDUCTEUR DES VINS

L. DEIBNER et J. MOURGUES

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Il existe peu de recherches œnochimiques concernant, d'une part, les influences de la concentration en ions hydrogène et de la température sur le potentiel oxydoréducteur des vins et, d'autre part, le rôle de l'agitation ou de la circulation de ces liquides, pendant la mesure du potentiel, sur la durée de sa stabilisation.

Dans ces conditions, il a paru utile d'effectuer des recherches plus systématiques pour combler, au moins en partie, les lacunes existantes.

I — INTRODUCTION

L'expression de l'état d'oxydoréduction des vins et les méthodes de référence de détermination de cet état ont fait l'objet de la résolution n° 10 adoptée par le Xe Congrès International de la Vigne et du Vin qui a tenu ses assises à Tbilissi (U. R. S. S.) au mois de septembre 1962.

Pendant les discussions relatives à ce sujet (Section Œnologie), ont été faites les propositions d'exprimer l'état oxydoréducteur par une valeur du potentiel, qui est l'expression directe d'une mesure potentiométrique, accompagnée obligatoirement des indications du pH du vin. Bien entendu, rien ne s'oppose à ce qu'après calcul, la valeur du rH_2 s'ajoute à deux indications principales. D'ailleurs, la Sous-Commission Conventionnelle des Méthodes d'Analyse et d'Appréciation des vins a recommandé, à la suite de sa cinquième réunion au mois de mai 1963, l'utilisation du potentiel, du pH, de la température et du rH_2 pour caractériser l'état oxydoréducteur d'un vin. Cette tendance de codifier non seulement l'expression de cet état, mais également le mode opératoire des mesures potentiométriques est une consé-

quence d'une certaine discordance, voire de l'anarchie qui se manifeste depuis longue date dans ce domaine si particulier de l'Œnochimie physique. En effet, les expérimentateurs sont divisés tout d'abord par les manières de faire une lecture potentiométrique finale : pour les uns la stabilisation du potentiel est admise après quelques mesures rapprochées ; par contre, les autres attendent, avec juste raison d'ailleurs, une stabilisation complète qui demande souvent un laps de temps considérable.

Les avis sont également discordants en ce qui concerne l'expression de l'état oxydoréducteur du vin : les uns se contentent de présenter les résultats des mesures potentiométriques uniquement en rH_2, tandis que les autres préfèrent donner à la fois les valeurs du potentiel et les concentrations en ions-hydrogène (pH).

Déjà en 1956, l'un de nous a proposé une technique des mesures du potentiel donnant des garanties suffisantes de précision et a préconisé l'uniformisation et la standardisation des modalités de ces mesures sur le plan international. Cette proposition a été renouvelée à plusieurs reprises (1957 *a*, *b*, 1963). Certes, le travail publié en 1956 n'est pas complet, puisque les rôles de la température, du pH, de l'agitation du vin n'ont pas été étudiés d'une manière particulière. Ces insuffisances nous ont amenés à effectuer les recherches correspondantes pour parfaire notre technique de détermination du potentiel oxydoréducteur.

I — RECHERCHES PERSONNELLES

Tout d'abord nous avons cherché à confirmer l'influence de la température, du pH, de la circulation ou de l'agitation du vin sur les résultats des mesures potentiométriques. Ensuite, nous avons jugé utile de préciser davantage les particularités du mode opératoire, établi en 1956, au point de vue de la préparation, du contrôle et de l'emploi des électrodes et de démontrer encore une fois la nécessité de faire appel à plusieurs électrodes de platine et d'attendre la stabilisation complète du potentiel.

A. — Étude de quelques facteurs

a) *Influence de la température*

L'influence de la température sur le potentiel oxydoréducteur est connue de longue date ; les exemples ne manquent pas en biochimie, en chimie organique et minérale. Nous citerons les travaux de Carter et Clover (1932) concernant le système fer ferrique : fer ferreux en milieu chlorhydrique, ceux de Mohai, Tapp et Neher (1961) relatifs aux ferri- et ferrocyanures de potassium. Dans ce dernier cas le potentiel diminue avec l'augmentation de la température dans l'intervalle étudié — 0 — 50°C. En outre, le potentiel augmente avec l'augmentation des concentrations. D'une façon générale, la température peut agir différemment sur l'activité des oxydants et des réducteurs (Carter, Clover, 1932).

En ce qui concerne les vins, leur chauffage à l'abri de l'air détermine, comme on le sait, une baisse du potentiel oxydoréducteur : Joslyn et Lukton (1956) ont montré que le potentiel des vins diminue sensiblement lors des variations de la température de 22°C à 45°C. Dans ces conditions nos essais avaient pour but d'apprécier

l'amplitude des variations du potentiel dans l'intervalle des températures comprises entre 15°C et 30°C et de confirmer notre conviction concernant l'obligation d'effectuer les mesures potentiométriques toujours à la même température si l'on utilise un vase à électrodes. Bien entendu, cette condition n'est pas valable lors des mesures du potentiel à l'aide des électrodes fixées à demeure dans les récipients de petite ou de grande capacité.

Tous nos essais ont été faits sur des vins rouges des Corbières (Aude), mis en bouteilles d'un litre et conservés pendant 2 mois et demi. Pour les mesures potentiométriques nous avons utilisé soit le millivoltmètre-potentiomètre enregistreur Micromax avec l'amplificateur de mesure A. M. (Société M. E. C. I., Paris), soit le potentionmètre portatif à piles, (Photovolt 125, Société Paris-Labo).

Le premier appareil permet de déterminer le potentiel à 1 mV près tandis que le deuxième est moins sensible, sa précision étant de 2,5 mV.

Les mesures du potentiel ont été effectuées en utilisant le récipient à électrodes et la technique de mesure décrits en 1956 (DEIBNER), avec une seule différence : le vase à électrodes comportait une jaquette thermostatique permettant de maintenir la température du vin à un niveau choisi grâce à une circulation d'eau portée à une température constante dans un bac muni d'un appareil thermostatique (Thermomix II, Éts Braun, Melsungen, Allemagne).

Le contrôle de la température du vin était effectué à l'aide d'un petit thermomètre plongeant dans un petit volume d'eau disposé dans une gaine en verre à bouchon rodé.

Il faut dire que la température de + 15°C a été obtenue en faisant circuler tout simplement l'eau du réseau urbain.

Pour effectuer les mesures du potentiel dans les vins contenus dans les bouteilles, nous avons utilisé pour les prélèvements un dispositif décrit dans nos publications précédentes (1950, 1953, 1957). D'ailleurs nous avons supprimé le système de la récupération du vin, en conservant le flacon d'eau pour le lavage du récipient à électrodes et la conduite d'amenée de gaz carbonique dans la partie supérieure de ce dernier. Bien entendu, le contrôle de la désaération de l'appareillage a été fait suivant les modalités connues.

Les mesures du potentiel à l'aide de deux électrodes doubles de platine, ce qui correspond à quatre électrodes simples, ont été facilitées par l'emploi d'une boîte à clés permettant de connecter successivement chacune de ces électrodes ; entre les mesures, le potentiomètre était branché sur une seule électrode.

Les mesures potentiométriques à différentes températures ont été exécutées dans la même journée pour un même vin et avec les mêmes électrodes de platine, lavées avec de l'eau distillée et ensuite laissées plongées dans l'eau distillée entre les mesures.

Le tableau 1 réunit les résultats obtenus. Les potentiels E_H exprimés en mV sont rapportés à l'électrode normale d'hydrogène ; ce sont les moyennes des indications des quatre électrodes de platine. Ces données sont complétées par les durées de stabilisation du potentiel, les mesures étant arrêtées lorsque $\Delta mV/T$ est égal à environ 0,2 mV/mn.

Comme on le voit, la température a une influence sur le potentiel oxydoréducteur du vin rouge ; il est d'autant plus bas que la température du vin est plus élevée. La durée de stabilisation du potentiel dépend également de la température à laquelle la mesure est faite : elle est très élevée à + 15°C.

Ces constatations n'ont rien d'étonnant puisque la température agit, comme on le sait, sur certaines réactions se produisant dans le vin. D'ailleurs l'essai n° B 1 qui a débuté par la mesure potentiométrique à + 30°C, démontre ce fait. En effet, le potentiel à + 15°C reste inférieur aux potentiels d'autres vins d'une même origine, en raison des modifications du milieu à la température de + 30°C.

Il ressort des essais effectués que les mesures du potentiel oxydoréducteur des vins doivent être effectuées à une température bien définie à + 20°C, par exemple. Cette condition implique la nécessité de disposer des vases à électrodes munis des jaquettes thermostatiques permettant la circulation de l'eau à la température indiquée.

TABLEAU I

Influence de la température sur le potentiel oxydoréducteur des vins — pH des vins 3,45

Potentiomètre utilisé	N° Essai	15° C		20° C		30° C	
		E_H mV	Durée de stabilisation	E_H mV	Durée de stabilisation	E_H mV	Durée de stabilisation
A — M. E. C. I.							
	1	—	—	220	1 h 30	209	1 h 15
	2	—	—	206	1 h 45	193	1 h
	3	238	2 h 15	—	—	200	1 h
B — PHOTOVOLT							
A	1	225	2 h 15	—	—	164	0 h 55
	2	213	2 h 15	217	1 h 45	186	0 h 50
	3	227	2 h 15	206	1 h 10	180	1 h
B	1	190	0 h 30	—	—	166	1 h 10

b) *Influence de la concentration en ions-hydrogène (pH)*

Nous avons utilisé le même lot des vins rouges des Corbières pour étudier l'influence de la concentration en ions-hydrogène sur le potentiel oxydoréducteur. Les lots de même vin, de pH 3,45, ont été d'une part, additionnés d'acide chlorhydrique N/10, et d'autre part, alcalinisés avec de la solution d'hydroxyde de sodium N /10 pour obtenir ainsi deux vins ayant les pH de 2,62 et 3,98 respectivement, mesurés à l'aide d'un potentiomètre (Radiometer 22). Le vin naturel et les deux vins avec les pH modifiés ont été conservés pendant 3 mois. Les mesures potentiométriques ont été faites au moyen du potentiomètre enregistreur (M. E. C. I., Paris), à la température de + 20° C, avec les mêmes électrodes, traitées suivant notre technique après chaque mesure. Le vase à électrodes était muni d'une jaquette thermostatique.

Les résultats des mesures sont consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Concentration en ions-hydrogène (pH)	E_H moyen mV	rH_2	$\frac{dE}{dpH}$	
			Intervalle des pH	E en mV
2,62	254,5	14,02	3,98-2,62	72,8
3,45 (vin naturel)	179,0	13,07	3,45-2,62	91,0
3,98	155,5	13,3	3,98-3,45	44,5

Il est facile de constater que le potentiel oxydoréducteur d'un vin est d'autant plus bas que le pH est plus élevé. Bien entendu, le rH_2 n'est pas constant. En plus,

les variations du potentiel résultant d'une variation de pH d'une unité ne sont pas uniformes. Les mêmes constatations ont été faites par JOSLYN et LUKTON (1956) reproduites dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Influence du pH sur le potentiel oxydoréducteur des vins
(d'après JOSLYN et LUKTON, 1956)

pH	E_H en mV	
	Durée de conservation, jours	
	0,25	3,8
2,5	445	367
3,0	414	319
3,3	400	329
4,0	303	257
5,0	259	163

En général, pour la variation du pH d'une unité celle du potentiel est de 58 mV à 20° C, de 59 à 25° C et de 60 mV à 30° C. Or, cette relation dépend du nombre d'atomes d'hydrogène apparus à la suite d'une réaction et peut osciller entre 30 et 120 mV (KOLLATH, STADLER, 1939), (MICHAËLIS, 1933), (CLARK, 1960).

Tous ces faits démontrent nettement la nécessité d'indiquer, à côté de la valeur du potentiel, le pH du milieu et l'impossibilité de caractériser l'état d'oxydoréduction des vins seulement par le rH_2 (J. RIBÉREAU-GAYON, 1963).

De toute façon, le rH_2, lié d'une manière indissoluble au pH, n'aura de sens qu'avec l'indication de celui-ci.

Remarquons que M. CLARK (1920) qui a créé la notion de rH_2, cherchait à caractériser l'intensité d'oxydoréduction sans nécessité de spécifier le pH, ce qui supposait que dans la région considérée une variation compensatrice de pH et du potentiel pouvait s'effectuer à rH_2 constant. Or, l'étude de divers systèmes montra à CLARK que les phénomènes étaient plus complexes qu'il n'avait d'abord imaginé et que les valeurs du rH_2 s'écartaient parfois de la constance de la modification du potentiel en fonction du pH (60 mV pour une unité de pH). En plus, CLARK (1939) constata des difficultés d'application de la notion du rH_2 au transfert des électrons. Finalement, il revient sur sa conception dans la deuxième édition de son traité et retire la notion du rH_2. Dans son ouvrage « Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems », paru en 1960, CLARK juge sévèrement la notion du rH_2 en la qualifiant comme une « nuisibilité immodérée » (« rH become an unmitigated nuisance », p. 45).

Signalons que HEWITT (1950) a également déconseillé l'utilisation du rH_2 en raison de son inexactitude. Tout en reconnaissant cette inexactitude RABOTNOVA (1957) considère que son emploi peut rendre quelques services en qualité d'indice d'oxygénation du milieu.

c) *Influence de l'agitation ou de la circulation du vin sur les résultats des mesures du potentiel oxydoréducteur*

1°) *Agitation.*

Pendant les mesures du potentiel des vins, sa stabilisation demande assez de temps, variable en fonction de l'état oxydoréducteur du milieu, de l'état des électrodes de platine. Il est naturel de rechercher les moyens d'écourter la durée des mesures potentiométriques et en premier lieu de faire appel à l'agitation du vin. Pour effectuer de tels essais, nous avons fait appel au vase à électrodes, muni d'un agitateur (moteur du Titrimètre n° 6612, Prolabo) dont la vitesse maximale de rotation est de 1 500 tours/minute. Ce vase a été décrit dans la publication de l'un de nous (DEIBNER 1953). Les électrodes au calomel et de platine étaient les mêmes que précédemment.

Les résultats des mesures effectuées sur les différents vins sont consignés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Influence de l'agitation du vin sur les résultats des mesures du potentiel oxydoréducteur — Température : 23°-25° C

Nature du vin	Sans agitation		Avec agitation	
	E_H moyen (mV)	Durée de stabilisation	E_H moyen (mV)	Durée de stabilisation
Vin rouge des Corbières (1962)	203	2 h	168	1 h 30
Vin rouge des Corbières (1962).....	192	2 h	162	1 h 30
Vin rouge de Coursan (Aude) (1962)	292	1 h 15	283	1 h 15
Vin Terret blanc (1961)	188	1 h	225	0 h 45
Vin blanc (1952).....	235	1 h 45	259	1 h 30
Vin doux naturel Villeneuve (Aude)	237	1 h 45	221	1 h 15
Vin doux naturel Villeneuve (Aude)	227	1 h 45	241	1 h 30
Muscat de Tunisie (1950).....	156	1 h	140	0 h 30

Le gain de temps de stabilisation est de l'ordre de 15-30 minutes pour les vins agités. Malheureusement les potentiels des vins agités et non agités sont différents. Cette différence atteint 35 mV pour les vins rouges. D'autre part, le potentiel des vins rouges agités est plus bas par rapport aux vins non agités. L'inverse se produit pour les vins blancs. Pour les vins expérimentés doux, le potentiel diminue ou augmente avec l'agitation.

Dans ces conditions nous ne pensons pas que l'agitation puisse être préconisée pendant les mesures du potentiel.

2°) *Circulation.*

La circulation du vin dans le vase à électrodes (DEIBNER 1956) a été réalisée à l'aide d'une pompe à tuyau flexible Wab (W. Bachofen, Basel, Suisse) présentant l'avantage de ne pas mettre le vin en contact avec les parties métalliques. La pompe Wab s'amorce facilement, est facile à nettoyer ; la désaération de la tuyauterie à l'aide d'un courant de gaz carbonique est aisée. En plus, la paroi

interne du tuyau flexible ne retient pas les substances colorantes des vins rouges même après un séjour prolongé du vin (24 h).

Nous avons été obligés de réduire le débit de la pompe à 4,5 litres/heure en faisant appel à une démultiplication poussée du mouvement d'un électromoteur et à un tube capillaire placé sur le refoulement. En effet, un débit plus élevé de la pompe provoque des remous dans le vin.

L'aspiration du vin s'effectue par l'intermédiaire du tube inférieur du vase à électrodes de DEIBNER (1956) et le refoulement par le tube latéral recourbé supérieur. La désaération de l'ensemble (vase, tuyauteries), les rinçages, le remplissage du récipient, sa vidange sont faites sans débrancher le tuyau flexible de la pompe grâce à l'installation sur le tuyau de refoulement de la pompe d'un tube en T, muni d'un robinet à trois voies. L'extrémité libre du tube en T sert à évacuer soit du gaz carbonique, soit du vin. Le rinçage de toutes les parties de l'ensemble avec du vin ne présente aucune difficulté puisque les robinets du vase à électrodes permettent les combinaisons voulues. Ajoutons que toutes les opérations sont faites avec le moteur en marche.

Les mesures du potentiel ont été faites à l'aide du potentiomètre portatif Photovolt. Chaque essai (avec ou sans pompe) est exécuté sur le même vin, issu de la même bouteille, mais le vin est renouvelé entre les mesures avec ou sans pompe. Après chaque mesure les électrodes de platine subissaient le traitement habituel indiqué dans notre précédente publication (DEIBNER, 1956).

Les résultats des mesures sont consignés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Influence de la circulation du vin sur les résultats des mesures du potentiel oxydoréducteur

Nature	Sans circulation		Circulation et ses effets			
			Circulation		Sans circulation mêmes électrodes	
	E_H moyen (mV)	Durée de stabilisation mn	E_H moyen	Durée de stabilisation	E_H moyen	Durée de stabilisation mn
Vin rouge des Corbières (1962) ..	282	20	363	10	—	—
Vin rouge des Corbières (1962) ..	295	40	371	20	344	60
Vin rouge des Corbières (1962) ..	309	60	389	45	304	15
Vin Terret blanc (1961)	160	75	358	30	286	60
Jus de raisin (1962) (sulfité-désulfité)	224	120	373	30	234	75

Les potentiels indiqués sont les moyennes des valeurs de deux électrodes doubles de platine, c'est-à-dire de quatre électrodes simples.

La troisième colonne présente les valeurs données par les électrodes de platine non traitées après les mesures avec circulation du vin, rincées, seulement à l'eau distillée et ensuite avec du vin.

Comme on le constate, le potentiel du vin ou du jus de raisin, mesuré pendant la circulation de ces liquides, est compris entre 358 et 389 mV quel que soit le potentiel du vin déterminé dans les conditions habituelles. Cette augmentation sensible du potentiel serait due soit à une électrisation du liquide au contact des parois du tuyau flexible soit au mouvement propre du vin ou du jus, puisque nous avons constaté

que les électrodes de platine disposées plus près du refoulement avaient le potentiel le plus élevé.

Les électrodes de platine, lavées avec de l'eau, gardent le « souvenir » de leur séjour dans le vin en circulation, comme le démontrent les chiffres de la 3e colonne du tableau. Ce « souvenir » disparaît après le traitement habituel des électrodes au moyen du perhydrol, des acides azotiques et chlorydrique et après le lavage prolongé à l'eau.

Par conséquent, la circulation du vin pendant les mesures potentiométriques n'apporte aucune amélioration ; au contraire, elle modifie considérablement l'état des électrodes de platine et peut-être celui du milieu.

B) Modalités des mesures du potentiel oxydoréducteur

Les règles pratiques de détermination du potentiel oxydoréducteur des vins constituent un domaine quelque peu délaissé. Or il est très important de définir exactement les modalités suivant lesquelles doit s'effectuer la mesure potentiométrique correcte caractérisée par un certain nombre de points particuliers. En premier lieu, il importe de disposer d'électrodes de platine susceptibles d'indiquer rapidement les valeurs reproductibles du potentiel ; leur préparation, leur traitement, leur sélection, leur étalonnage constituent les manipulations essentielles. D'autre part, il est indispensable d'attendre pendant les mesures une stabilisation complète du potentiel et de tenir compte que l'exactitude des mesures est tributaire d'un nombre minimal d'électrodes de platine en raison de la difficulté d'obtenir leurs réponses identiques.

a) *Électrodes de platine*

1°) *Traitement des électrodes.*

Avant toute mesure les fils des électrodes de platine doivent être nettoyés à l'aide d'un procédé de traitement chimique. Les procédés de nettoyage sont variables.

Après une série d'essais l'un de nous (Deibner, 1956) a établi un procédé efficace et sûr, comprenant quatre opérations distinctes ; les trois premières sont les traitements par l'eau oxygénée à 110 volumes, ensuite successivement par les acides azotique et chlorhydrique concentrés, la dernière est un lavage prolongé à l'aide de l'eau courante. Ce mode opératoire nous a donné satisfaction. Malheureusement il a un caractère oxydatif puisque les électrodes de platine ainsi traitées accusent, au début des mesures des valeurs élevées du potentiel. Cette circonstance nous a incité a entreprendre des essais sur le remplacement du perhydrol par une substance réductrice appropriée afin d'obtenir d'une part, les électrodes de platine à l'état de réduction et, d'autre part, de diminuer la durée de la stabilisation du potentiel. Les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants pour le moment. De telles recherches doivent en principe englober l'étude de l'utilisation de l'électrolyse en milieu acide, comme l'ont fait Bezssonoff et Mme Woloszyn (1939), Palacios et Vecino (1953) et du chauffage électrique des fils de platine (Costa, 1959).

2°) *Étalonnage des électrodes.*

La solution oxydoréductrice de Michaëlis (1933), recommandée par Baylet (1938) (Canals, Baylet, 1939), est extrêmement commode puisque son potentiel

(406 ± 1 mV à 20°C), obtenu en absence de quinhydrone, est stable à condition de la conserver dans les flacons en verre jaune et à l'abri de la lumière. En effet, l'anion hexacyanoferrique (III), $(FeCy_6)^{3-}$ est photosensible et se décompose avec formation d'anions cyanhydriques. D'ailleurs, d'après HILL (1956), c'est en raison de cette décomposition que le système hexacyanoferrate (III) : hexacyanoferrate (II) peut donner des valeurs erronnées du potentiel. Il est plus prudent de préparer cette solution tous les deux ou trois mois.

Toujours d'après HILL (1956) d'autres solutions oxydoréductrices, telles que le système ferro-ferrioxalate et les systèmes du type quinone : hydroquinone sont moins commodes.

En ce qui concerne l'utilisation de différents tampons nécessitant la présence de quinhydrone, nous préférons l'éviter en raison du danger d'empoisonnement des électrodes de platine par les produits d'altération de cette substance (LERWATO WICZ, 1959).

L'étalonnage des électrodes de platine à l'aide de la solution oxydoréductrice de MICHAËLIS doit se faire exactement à la température de + 20° C. En général, il demande quelques minutes ou plus, parfois jusqu'à 30 minutes, suivant la pureté et l'état du platine. On note les écarts, qui sont de l'ordre de ± 4 mV au maximum, pour toutes les électrodes, ce qui permet de faire les corrections nécessaires. Les écarts plus élevés conditionnent les traitements répétés des électrodes jus u'à l'obtention des valeurs convenables ou finalement l'élimination des électrodes défectueuses.

A notre avis, le nombre minimal d'électrodes de platine à utiliser pendant les mesures du potentiel ne doit pas être inférieur à quatre électrodes simples.

b) *Durée de stabilisation du potentiel*

Le potentiel oxydoréducteur des vins et des jus de raisin ne s'établit pas très rapidement, surtout pour les vins conservés à l'abri de l'air.

En principe, les mesures doivent être considérées comme terminées, si les valeurs du potentiel, données par chaque électrode, ne diffèrent pas de 2, 5 mV —5 mV par rapport à la valeur notée précédemment, les mesures étant faites toutes les 10-15 minutes.

Il est également important de préciser la valeur de chute du potentiel en fonction du temps, $\frac{\Delta mV}{T}$ qui pourrait se situer aux environs de 0,2 mV/minute, ce qui équivaut à la variation du potentiel de ± 3,5 mV dans 15 minutes. Comme l'un de nous a montré précédemment (DEIBNER, 1956) cette condition n'est pas excessive au point de vue des tolérances de l'exactitude des mesures.

En général, au début, les mesures du potentiel sont effectuées toutes les 15 minutes, ensuite, si cela est nécessaire, à intervalles de 30 minutes, et à la fin toutes les 10 ou 15 minutes.

Les milieux à potentiel limite, comme les vins, présentent souvent les décalages entre les indications des électrodes de platine. En moyenne, la différence maximale entre les valeurs observées est de 10 mV et la différence entre les indications des deux fils de platine d'une électrode double peut atteindre 5 mV.

La nécessité d'attendre la stabilisation complète du potentiel en fonction du temps

est impérative. En effet, les procédés rapides de la mesure du potentiel sont extrêmement conventionnels.

D'ailleurs il est facile de montrer que les premières mesures du potentiel accusent une différence plus ou moins accentuée suivant l'état oxydoréducteur des électrodes de platine par rapport à celui du vin.

L'un de nous (DEIBNER) a mis largement en évidence, dans le mémoire paru en 1956, les dangers et les inconvénients des procédés dits rapides de la mesure du potentiel. Les résultats du tableau 6 complètent les constatations précédentes.

TABLEAU 6

Évolution du potentiel oxydoréducteur de quelques vins pendant sa mesure en fonction du temps. Température : 19-21° C

Nature du vin	N° Électrodes de platine	E_H mV — Temps, minutes															Résultats	
		0	10	15	20	30	40	45	60	70	75	90	105	120	135	150	E_H moyen	Durée
1) Vin rouge des Corbières (Aude) 1962	1 R	380	320	—	310	305	302	—	301	—	—	—	—	—	—	—	296	40
	1 B	392	326	—	311	307	302	—	301	—	—	—	—	—	—	—		
	2 R	370	305	—	295	290	290	—	290	—	—	—	—	—	—	—		
	2 B	360	302	—	292	290	290	—	289	—	—	—	—	—	—	—		
2) Vin rouge des Corbières (Aude) 1961	1 R	445	—	358	—	255	—	200	178	—	—	165	160	158	—	—	153	128
	1 B	450	—	380	—	278	—	220	198	—	—	170	165	160	—	—		
	3 R	305	—	220	—	180	—	170	152	—	—	148	142	142	—	—		
	3 B	310	—	228	—	182	—	175	168	—	—	158	158	152	—	—		
3) Vin rouge de presse, 1961	1 R	290	—	—	130	111	92	91	—	—	—	—	—	—	—	—	88	60
	1 B	280	—	—	120	104	—	90	88	87	—	—	—	—	—	—		
	4 B	270	—	—	112	110	—	88	86	86	—	—	—	—	—	—		
4) Vin Terret blanc, 1961	1 R	342	—	282	—	272	—	268	268	—	264	260	252	245	240	235	232,5	150
	1 B	348	—	282	—	272	—	268	268	—	264	258	252	245	240	235		
	2 R	390	—	298	—	275	—	263	263	—	260	254	248	240	235	230		
	2 B	360	—	292	—	274	—	263	263	—	258	254	248	240	235	230		
5) Jus de raisin, 1962	1 R	360	—	255	—	242	—	237	230	—	222	222	222	—	—	—	227	90
	1 B	370	—	262	—	250	—	240	232	—	228	222	222	—	—	—		
	2 R	378	—	270	—	260	—	250	242	—	236	232	232	—	—	—		
	2 B	375	—	270	—	260	—	250	240	—	236	232	232	—	—	—		

C'est ainsi que l'essai n° 2 (vin rouge des Corbières, 1961) condamne nettement tous les procédés préconisant de considérer le résultat de la mesure au bout de 15 minutes comme le potentiel définitif.

Tout d'abord, au bout de 15 minutes, la différence entre deux paires d'électrodes de platine est de l'ordre de 160 mV. Or, au bout de 2 heures, le potentiel moyen est de 153 mV, et la chute du potentiel s'établit par les valeurs extrêmes (380 mV et 220 mV) entre 227 mV et 67 mV.

Ensuite, si l'on employait seulement deux électrodes et notamment celles numérotées 1 R et 1 B, le procédé rapide devrait accepter comme potentiel définitif, une valeur comprise entre 380 et 358 mV, ce qui est excessif par rapport à la valeur définitive de 153 mV.

Le vin Terret blanc, 1961, constitue un exemple assez rare de posséder deux paliers, l'un correspondant au potentiel de 263-268 mV et l'autre, pris comme potentiel définitif, de 230-235 mV.

Tous les vins du tableau 6 démontrent la nécessité d'attendre patiemment la stabilisation définitive du potentiel, qui demande parfois assez de temps, variable en fonction de l'état du vin et celui des électrodes de platine, dont le nombre minimal ne doit pas être inférieur à quatre.

Signalons en passant que LIPIS (1957) insiste également sur l'importance d'obtenir la stabilisation complète du potentiel.

III — CONCLUSION

Un certain nombre d'observations, signalées au cours de cet exposé, nous autorisent à affirmer que pour le moment les modalités suivant lesquelles doivent s'effectuer les mesures du potentiel des vins sont celles préconisées par l'un de nous, depuis 1956, auxquelles s'ajoute actuellement l'obligation de les faire à la température constante de + 20° C, si l'on utilise les vases à électrodes. Cette condition implique la nécessité de doter ces derniers de chemises thermostatiques facilitant la circulation de l'eau portée à la température indiquée. Soulignons encore une fois l'importance d'attendre une stabilisation complète du potentiel, indiqué par quatre électrodes de platine au minimum, sans recours ni à l'agitation, ni à la circulation du vin.

Tout au plus il faut se contenter des renouvellements répétés du vin dans le vase à électrodes avant le commencement des mesures.

Quant à l'expression de l'état d'oxydoréduction des vins, elle doit comprendre une valeur moyenne du potentiel en millivolts, la concentration en ions-hydrogène, exprimée en pH, la température, si la mesure a été faite à la température autre que celle de + 20° C et éventuellement la valeur du rH_2.

En tout cas, actuellement rien ne nous autorise à simplifier, pour des raisons de commodité, sans expérimentation comparative, le mode opératoire de détermination du potentiel des jus de raisin et des vins.

Sa simplification, vers laquelle on doit s'efforcer de parvenir au possible, est concevable, à notre avis, dans le domaine de la préparation des électrodes de platine brillant, douées d'une réponse rapide. Sans aucun doute d'autres recherches seront nécessaires pour résoudre ce problème particulier.

En attendant, l'utilité de la normalisation du mode opératoire des mesures du potentiel oxydoréducteur des vins, valable à l'échelle internationale, mérite d'être prise en considération sans trop tarder.

Reçu pour publication en octobre 1963.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF CERTAIN FACTORS ON THE MEASUREMENT OF THE OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL IN WINE

Research had demonstrated the need to carry out the measurement of the oxidation-reduction potential of wine in electrode-bearing vessels at + 20°C and to express this in millivolts, including an indication of the H-ion concentration with, or without, the corresponding rH_2 value of the wine.

A critical study had made it possible to define the conditions for determining this potential and for preparing the platinum electrodes, without disturbing or causing the wine to circulate during the course of the measurement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anonyme, 1963 *a*. L'expression de l'état d'oxydoréduction des vins et méthodes de référence de détermination de cet état. Résolution n° 10, Xe Congrès Intern. Vigne, Vin, Tbilissi, U. R. S. S., Sept. 1962. *Bull. O. I. V.*, **35**, n° 3, 1436.

Anonyme, 1963 *b*. Compte rendu de la IVe Réunion de la Sous-Commission des méthodes d'analyse O: I. V., Paris, mai 1963. *Bull. O. I. V.*, **36**, n° 389, 850.

Baylet H., 1938. Contribution à l'étude des essais physiques des vins. *Thèse Pharmacie, Montpellier.*

Bezssonoff N., Woloszyn M., Mme, 1939. La relation exacte entre le potentiel de platine et la teneur en vitamine C des solutions exposées à l'air. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 319.

Canals E., Baylet H., 1939. Le potentiel oxydoréducteur de quelques vins. *J. Pharm. Chim.*, **29**, 503-510.

Carter R., Glover T., 1932. The influence of oxidation potentiels of mixtures of ferric and ferrous chlorides in hydrocloric acid solution. *J. Phys. Chem.*, **36**, n° 2, 679.

Clark W. M., 1920. *The determination of hydrogen ions.* The Williams and Wilkins C°, Baltimore.

Clark W. M., 1939. Some elementary aspects of the potentiometric study of oxidation-reduction equilibria. *Cold Spring Harbor Symposia, Quant. Biol.*, **7**, 1.

Clark W. M., 1960. *Oxidation-reduction potentials of organic systems.* Baillère, Tindall and Cox, London.

Costa E., 1959. Investigation into measuring redox potentials in wines. *Amer. J. Enol. Vit.*, **10**, n° 2, 56-60.

Deibner L., 1953. Quelques dispositifs spéciaux facilitant les mesures potentiométriques dans les vins à l'abri de l'air. *Ann. Fals. Fraudes*, **46**, 111-122.

Deibner L., 1956. Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Ann. Technol. agric.*, **5**, n° 1, 31-67.

Deibner L., 1957 *a*. Die Bedeutung des Redoxpotentials für die Fruchtsäfte und dessen Bestimmung. *Fruchtsaft-Industrie*, **2**, 19-32.

Deibner L., 1957 *b*. Potentiel oxydoréducteur des vins : son importance, sa signification ; tendances actuelles de la technique de sa mesure. *Ind. Agr. Alim.*, **74**, n° 4, 273-283.

Deibner L., 1963. Phénomènes d'oxydoréduction au cours de la maturation et du vieillissement du vin et procédés pour les modifier. Rapport national français au Xe Congrès International de la vigne et du vin, septembre 1962, Tbilissi, U. R. S. S. *Bull. O. I. V.*, **36**, n° 387, mars 715-733.

Hewitt L., 1950. *Oxidation-reduction potentials in Bacteriology and Biochemistry.* 31 Livingstone, Edinburgh

Hill R., 1956. Oxidation réduction potentials *in* : Paech K., Tracey M. *Modern Methods of Plant Analysis*, **1**, 393, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Joslyn M., Lukton A., 1956. Mechanism of cooper casse formation in white table wine. I — Relation of changes in redox potential to copper casse. *Food. Res.*, **21**, n° 3, 384-396.

Kollath W., Stadler P., 1939. Reduction-oxidation potentials and metabolism. *Erg. Phys.. Biol. Chem., Exper. Pharm.*, **41**. (D'après Rabotnova I., 1957.)

Lewartowicz E., 1959. Empoisonnement et activation des électrodes de platine et d'or dans des solutions de quinhydrone. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **248**, 2996.

Lipis B., 1959. Paramètres pour la régulation du traitement accéléré des vins de table ordinaires (titre tra-

duit). *Troudy Mold. naoutchnoissled Inst. sadov. vinogr. vinod.* (Trav. Inst. Moldavie Rech. Sci. horticulture, Viticulture, Œnologie), **4**, 123-185.

MICHAËLIS L., 1933. *Oxydation-Reduction Potentials.* 60 Springer-Verlag, Berlin.

MOHAI B., PAPP S., NEHER E., 1961. Oxidation-reduction systems. I — Effets of concentration and temperature on the oxidation-reduction potential of the potassium ferrocyanide-potassium ferricyanide system. *Veszpremi Veg. Eg. Kozlemen,* **5**, 73-83 (d'après *Chem. Abstr.*, 1962, **57**, n° 6, 7008-*f*).

PALACIOS Y., VECINO J., 1953. Influencia de la fase gaseosa sobre el potencial del platino en diferentes electrolitos. *Rev. Fis. Quim. Esp.*, **49**-B, n° 7-8, 501.

RABOTNOVA I., 1957. *Rôle des conditions physicochimiques* (*pH et* rH_2) *dans la vie des microorganismes* (titre traduit). Ac. Sci. U. R. S. S., Moscou.

RIBÉREAU-GAYON J., 1963. Phénomènes d'oxydoréduction au cours de la maturation et du vieillissement du vin et procédés pour les modifier. Rapport général, Xe Congrès Intern. Vigne et Vin, Tbilissi, U. R. S. S. sept., 1962. *Bull. O. I. V.*, **36**, mai 582.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 45-66

QUALITÉ PROTÉIQUE ET FORCE DES BLÉS

A. BOURDET

avec la collaboration technique de Renée BERRIER et Ginette GOBIN

Laboratoire d'Études sur la Qualité des Blés,
École française de Meunerie, 16 rue Nicolas-Fortin, Paris 13e

---

SOMMAIRE

Du double point de vue de sa quantité et de sa qualité, le matériel protéique du grain, tributaire du patrimoine génétique, conditionne cette caractéristique technologique qu'est la force des blés.

Fondé sur les propriétés de gonflement des protéines du gluten en milieu acide, l'essai de sédimentation de ZELENY constitue une méthode simple et rapide d'appréciation de la force susceptible d'intéresser les milieux de la sélection, de la production et de l'utilisation ; il permet en outre d'exprimer plus spécifiquement la qualité intrinsèque des protéines.

Le présent travail définit les caractéristiques de sédimentation de différentes variétés françaises et étrangères comparativement au critère alvéographique utilisé classiquement en France comme mesure de la force des blés.

Il précise d'autre part la variabilité des critères étudiés et détermine le degré de leur interdépendance.

A l'échelon variétal enfin, il examine l'incidence des variations du taux de protéines sur les différents modes d'expression de la force, y compris la qualité protéique.

INTRODUCTION

Caractéristique à la fois génétique et technologique, la force des blés est pour une large part tributaire du matériel protéique du grain du double point de vue de sa quantité et de sa qualité.

Ces deux éléments devraient donc constituer simultanément la base de toute méthode rationnelle d'appréciation de la force.

Or, si la détermination de la teneur d'un blé en protéines ou en gluten est une opération analytiquement simple, il n'en va plus de même lorsqu'il s'agit de chiffrer la qualité intrinsèque de ces protéines.

Les différentes méthodes qui ont tenté de mesurer de façon directe les propriétés du gluten n'ont guère eu la faveur des céréalistes en raison même de leur imprécision et des difficultés de leur exécution. Par contre, celles qui ont cherché à apprécier indirectement ces propriétés par des mesures effectuées sur pâtes ont connu une très large diffusion.

Les céréalistes des différents pays producteurs de blé n'attachent pas tous la même importance aux facteurs quantité et qualité des protéines dans l'appréciation de la force, aux stades de la sélection ou de la commercialisation. Pour certains, la teneur en protéines ou en gluten constitue un critère essentiel. D'autres, au contraire, considérant l'influence plus ou moins profonde des facteurs du milieu, ne lui attribuent pas de signification génétique et estiment qu'une mesure des propriétés des protéines par l'intermédiaire de celles des pâtes constitue une appréciation plus spécifique de la force.

L'intérêt soulevé par la méthode dite de sédimentation publiée par ZELENY en 1947 dans sa première version et en 1957 dans sa version définitive par PINCKNEY, GREENAWAY, ZELENY, s'explique sans doute par les incontestables avantages qu'elle offrait sur le plan analytique par sa simplicité et sa rapidité. Mais c'était également la première fois qu'une méthode d'appréciation de la force associait dans une même détermination les facteurs quantité et qualité du matériel protéique des blés. Fondée sur les propriétés de gonflement des protéines du gluten en milieu acide, elle appliquait directement aux farines le principe utilisé antérieurement par BERLINER et KOOPMAN, 1929 dans le cas du gluten préalablement isolé.

L'étude bibliographique que nous avons consacrée récemment à la méthode de sédimentation témoigne de l'ampleur des travaux qu'elle a suscités à l'échelle mondiale dans tous les milieux préoccupés des problèmes touchant la qualité des blés (BOURDET, 1963).

I. — L'INDICE SPÉCIFIQUE DE SÉDIMENTATION COMME EXPRESSION DE LA QUALITÉ DES PROTÉINES

En s'appuyant sur les données du calcul statistique, différents auteurs ont voulu voir dans l'indice de sédimentation un moyen pratique d'apprécier rapidement la teneur des blés en protéines. D'autres ont, de la même façon, démontré qu'il existait une interdépendance souvent étroite entre les valeurs de sédimentation et la plupart des critères appréciant les propriétés plastiques des pâtes.

Tenant compte que la méthode qu'il proposait exprimait par une seule et même valeur les caractéristiques quantitatives et qualitatives des protéines, ZELENY (1947) a proposé d'estimer le facteur qualité par un *indice spécifique de sédimentation* (Is) fourni par le rapport :

$$\text{Is} = \frac{\text{Indice de sédimentation}}{\text{Teneur en protéines de la farine}} = \frac{S}{P}$$

dans lequel S et P sont exprimés sur la base d'un taux d'humidité de la farine de 14 p. 100.

Parmi les très nombreux travaux consacrés à l'essai de sédimentation, il en est peu qui semblent s'être intéressés à cette expression de la force des blés d'où se trouve éliminée l'influence quantitative des protéines.

Ayant constaté l'influence exercée par la teneur en cendres des farines sur les valeurs de sédimentation, et afin de permettre une meilleure différenciation entre les échantillons, le céréaliste allemand SCHAEFFER (1957) a proposé de définir la qualité des protéines par un indice spécifique modifié Is (*m*), tenant compte de la teneur en matières minérales des farines expérimentales :

$$\text{Is } (m) = \frac{\text{Indice de sédimentation}}{\text{teneur en protéines de la farine}} \times \text{teneur en cendres} \times 100.$$

Sur 11 variétés de blés, il obtient des valeurs comprises entre 11,4 et 52,5 pour l'indice de sédimentation, entre 1,4 et 4,1 pour l'indice spécifique et entre 52 et 218 pour l'indice spécifique modifié.

Indépendamment de l'expression préconisée par SCHAEFFER, l'indice spécifique de sédimentation a été utilisé aux États-Unis (ZELENY et *al.*, 1960) aux Pays-Bas (BELDEROK, MEPPELINK et DE RUITER, 1960) dans des études en relation avec les propriétés des pâtes (temps de pétrissage et résistance au pétrissage) et les résultats de la panification (volume des pains).

ZELENY et *coll.* (1960) ont fait appel au même critère dans un travail de sélection intéressant 150 hybrides de blé « Hard » de printemps, représentant la 3e génération d'un croisement entre une variété à gluten fort et à teneur élevée en protéines (*Conley*), et un blé à gluten faible pauvre en protéines, mais résistant à certains insectes parasites.

En s'appuyant sur les données du calcul statistique au terme d'une étude intéressant un grand nombre d'échantillons, ZELENY (1962) a proposé plus récemment d'exprimer la qualité protéique en rapportant les valeurs de sédimentation à une teneur en protéines uniforme de 12 p. 100. Une telle expression, qui facilite la comparaison des différentes variétés sur le plan de la qualité, se justifie, selon lui, par le fait qu'aux U. S. A., la teneur en protéines des blés « Hard » est peu influencée par le milieu et relativement constante pour une même variété.

Cette conception a été vivement critiquée par MATTERN et EASTIN (1962) qui considèrent qu'il s'agit là d'une estimation grossière de la qualité.

Aussi valables ou discutables que puissent être les arguments présentés de part et d'autre, la qualité des protéines constitue un facteur trop important de la force des blés pour qu'il soit négligé.

Du fait qu'elle peut être appliquée à des échantillons de faible importance, que, par son principe même, elle concerne directement le matériel protéique du grain et qu'elle permette en outre d'en exprimer plus spécifiquement sa qualité, la méthode de sédimentation présente, sur le plan particulier de la sélection, un incontestable intérêt.

Le travail que nous avons entrepris à cet égard poursuivait plusieurs buts :

— définir les caractéristiques de sédimentation de différentes variétés françaises et étrangères comparativement au critère utilisé classiquement en France comme mesure de la force des blés ;

— préciser la variabilité de chacun des critères étudiés et déterminer le degré de leur interdépendance ;
— étudier, à l'échelon variétal, l'incidence des variations du taux de protéines sur les différents modes d'expression de la force, y compris la qualité protéique.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

1) *Matériel d'étude*

Nos essais ont concerné d'une part des blés français, constitués de variétés cultivées ou d'hybrides en cours d'étude, d'autre part des blés étrangers originaires de différents pays d'Europe et des U. S. A.

Blés français.

La totalité des échantillons étudiés provenait de différentes stations de l'I. N. R. A.

— 38 variétés, représentant un total de 364 échantillons récoltés en 1959 ont été examinées. Une dizaine d'entre elles seulement constituent environ 75 p. 100 des surfaces nationales emblavées. A l'exception de quelques variétés alternatives ou de printemps, il s'agit de blés d'hiver.

— En ce qui concerne les hybrides en cours de sélection, nous avons examiné plusieurs lots d'origine différente représentant un total d'environ 400 échantillons pour la récolte 1959 et d'une centaine pour la récolte 1960.

Blés étrangers.

— Un circuit d'analyse, organisé par l'Association européenne pour l'amélioration des plantes nous a permis d'inclure dans cette étude 13 variétés européennes récoltées entre 1958 et 1960 dans 6 pays différents. Les échantillons d'origine autrichienne et italienne sont des blés d'hiver ; ceux en provenance d'Allemagne, de Belgique, de Suède et de Suisse correspondent à des variétés d'hiver ou de printemps.

— Les déterminations ont porté d'autre part sur 8 variétés d'origine américaine, représentatives des principaux types de blés cultivés aux U. S. A. (*club*, *soft*, et *hard*) les uns d'hiver, les autres de printemps. De même que les échantillons d'origine française, tous ces blés étrangers appartiennent à l'espèce *Triticum vulgare*.

Préparation des farines expérimentales.

Les blés sont conditionnés pendant 12 à 15 heures à une humidité de 16,5 p. 100. Les moutures sont effectuées au moulin expérimental automatique BUHLER, avec des rendements en farine variant de 68 à 72 p. 100 selon les échantillons.

A titre de comparaison et dans quelques cas seulement, l'emploi d'un autre type de moulin d'essai (modèle EFM) a limité le taux d'extraction aux alentours de 50-55 p. 100.

2) *Méthodes analytiques*

— La teneur en *protéines totales* des blés et des farines a été déterminée selon KJELDAHL, et celle en *gluten sec* dans les conditions classiques, par extraction manuelle à l'eau du robinet.

— La mesure de *l'indice alvéographique*, exprimé par W, a été faite selon le protocole expérimental défini par CHOPIN, exception faite du taux d'extraction des farines.

— *L'indice de sédimentation* a été déterminé dans les conditions décrite par PINCKNEY, ZELENY et *coll.* (1957) et l'agitation des cylindres faite à la main. La teneur en eau des farines expérimentales étant voisine de 14 p. 100, aucun coefficient de correction n'a été appliqué et les valeurs de sédimentation indiquées concernent l'indice brut S.

III. — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

1 — La qualité des protéines comme critère de la force des blés

Une des premières préoccupations de cette étude a été de préciser la valeur de l'indice spécifique de sédimentation défini par Zeleny selon qu'il est établi à partir de la teneur en protéines totales des blés ou des farines ou de la teneur des farines en gluten sec.

Ces déterminations ont été effectuées sur les blés étrangers et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1 suivant.

Du fait de la diversité de leur nature et de leur origine, les 28 blés examinés constituent une gamme très large sous l'angle des teneurs en protéines totales, qui s'échelonnent de 9,2 p. 100 (*Stella*) à 17,6 p. 100 (*Selkirk*).Cette diversité se reflète dans la composition des farines dont les teneurs en protéines sont comprises elles-mêmes entre 7,7 p. 100 (*Alba*) et 16,6 p. 100 (*Selkirk*) et celles en gluten sec de 5,7 p. 100 (*Omar*) à 17,5 p. 100 (*Selkirk*).

Il en est de même en ce qui concerne la force des échantillons étudiés. Les indices de sédimentation s'échelonnent entre 9 (*Omar*) et 67 (*Karn II 59*) et les indices alvéographiques de 35 (*Omar*) à 350 (*Conley*).

Déterminés à partir des valeurs de sédimentation, les indices de qualité protéique sont eux-mêmes compris :

— entre 0,95 (*Omar*) et 4,60 (*Karn II 59*) quand on considère les teneurs en protéines des blés.

— entre 1,15 (*Omar*) et 4,96 (*Karn II 59*) lorsqu'il s'agit des taux de protéines des farines,

— entre 1,54 (*Lucas*) et 5,50 (*Karn II 59*) si l'on tient compte des teneurs en gluten sec.

Selon que la détermination quantitative du matériel protéique des blés concerne le grain entier, la farine, ou le gluten que l'on en a extrait, les valeurs exprimant la qualité protéique sont donc différentes, mais demeurent relativement comparables.

Si, en effet, on établit un classement des blés en fonction de leur qualité protéique, et qu'on les répartisse par exemple en 3 catégories, la répartition est identique quel que soit le mode d'expression utilisé. C'est ce qu'indiquent les valeurs suivantes :

Catégorie	S/P blés	S/P farines	S/gluten sec	Nbre d'échantillons
A	< 2	< 2,5	< 2,8	10
B	2 à 3	2,5 à 3,5	2,8 à 3,9	11
C	> 3	> 3,5	> 3,9	7

Lorsque l'on considère les teneurs en protéines totales des blés ou des farines, les blés se classent en fonction de leur qualité protéique dans le même ordre à l'intérieur des catégories A et C ; on observe quelques fluctuations à l'intérieur de la catégorie B.

TABLEAU I

Teneur en protéines, qualité protéique et force de différents blés étrangers

Origine	Blés	Récolte	Protides (% de ss.)		Gluten sec (% ss.)	Indice alvéogr. W (2)	Indice sédiment. S (2)	Qualité protéique		
			blés	farines				S/Prot blés	S/Pr farines	S/Gluten sec
Allemagne	*Taca*	1958	10,4	8,8	8	150	28	2,69	3,18	3,50
	Koga II (1)	—	14	12,3	11,4	223	42	3	3,42	3,68
Autriche	*A. Bankut*	—	15,8	14,6	13,6	148	38	2,40	2,61	2,80
	Record	—	14,9	14,1	12,7	245	41	2,75	2,91	3,23
	—	1959	15,8	13,9	12,2	247	47	2,97	3,38	3,85
	—	1960	15,4	13,6	11,4	298	51	3,31	3,75	4,47
Belgique	*Alba*	1958	9,4	7,7	6,3	97	16	1,70	2,08	2,56
	Jufy II (1)	—	10,5	8,9	7,8	79	25	2,38	2,81	3,20
	Stella	1959	9,2	7,9	6,2	62	16	1,74	2,03	2,58
	—	1960	11,3	9,3	7,9	76	17	1,50	1,84	2,15
Italie	*Mara*	1958	11,6	9,8	8,2	108	23	1,98	2,35	2,81
	San Pastore	—	10,4	9	7,6	43	12	1,15	1,34	1,57
Suède	*Banco*	1958	12,4	10,5	9,1	211	35	2,82	3,33	3,85
	Karn II (1)	—	13,9	12,1	10,7	255	53	3,81	4,38	4,95
	—	1959	14,6	13,5	12,2	214	67	4,60	4,96	5,50
	—	1960	13,2	11,5	9,8	216	52	3,94	4,52	5,30
Suisse	*Probus*	1958	12,9	11,9	11,8	292	47	3,64	3,95	3,98
	Lichti Früh (1)	—	11,4	10,2	8,3	286	36	3,16	3,53	4,36
	—	1959	13,6	12,2	10,2	235	31	2,28	2,54	3,04
	—	1960	12,6	10,6	8,4	250	33	2,62	3,11	3,93
U. S. A.	*Omar (Club)*	1961	9,5	7,8	5,7	35	9	0,95	1,15	1,58
	Lucas (S. R)	—	10,9	9,5	9,1	82	14	1,28	1,47	1,54
	Trumbull (S. R)	—	12,3	11,4	10,6	89	24	1,95	2,10	2,26
	Brevor (S. W)	—	11,6	9,5	9	99	22	1,90	2,32	2,45
	Early Triumph (H. R)	—	13,1	11,8	11,5	137	26	1,98	2,20	2,26
	Bison (H.R)	—	13,9	13	12,7	327	42	3,02	3,23	3,31
	Selkirk (H.R) (1)	—	17,6	16,6	17,5	275	48	2,73	2,89	2,74
	Conley (H. R) (1)	—	17,1	15,8	15,4	350	56	3,27	3,55	3,64

(1) Blés de printemps (2) Farines extraites à 67-72 p. 100 (moulin Buhler)

Le classement n'est pas aussi reproductible lorsqu'on exprime la qualité protéique en fonction des taux de gluten sec. Cette moins bonne concordance résulte sans doute d'une certaine variabilité dans la détermination du gluten sec, moins précise que le dosage chimique de l'azote sur les blés et les farines.

De ce point de vue, l'expression de la qualité protéique d'un blé faisant intervenir sa teneur en gluten, ne présente donc pas d'intérêt particulier. Si l'on considère d'autre part que la teneur en protéines des farines expérimentales peut être plus ou moins modifiée par les conditions de mouture et même, dans certains cas, apparaître supérieure à celle du blé initial (HALTON, BAKER, JONES, 1961), son utilisation dans l'expression de la qualité protéique risque de constituer une source supplémentaire de variations.

Bien que les farines expérimentales utilisées dans cette étude, en raison même de leur taux d'extraction élevé, puissent être considérées comme suffisamment représentatives des blés correspondants, nous avons estimé que l'expression de la qualité protéique, sur la base de la teneur en protéines totales du blé lui-même, constituait un critère plus spécifique de cette qualité.

En conséquence, nous avons convenu d'appeler « qualité protéique » d'un blé le rapport de l'indice de sédimentation déterminé sur farine à la teneur en protéines totales du blé correspondant, soit :

$$\text{Qualité protéique} = \frac{\text{Indice de sédimentation}}{\text{Protéines totales du blé (p. 100 ss)}} = \frac{S}{P}.$$

Bien que différente de celle proposée par ZELENY, cette expression permet, de la même façon ,une comparaison relative des blés entre eux.

2. — EXPRESSION COMPARÉE DE LA FORCE DES BLÉS SELON DIFFÉRENTS CRITÈRES

Les résultats du tableau 1 relatifs aux blés étrangers permettent une comparaison de la valeur « force » selon qu'elle est exprimée par l'indice alvéographique, l'indice de sédimentation ou la qualité protéique.

En se référant à la classification adoptée d'ordinaire pour les blés français à partir de l'indice alvéographique, on peut répartir les blés examinés en 4 groupes distincts dont les W sont respectivement supérieurs à 150, compris entre 120 et 150, entre 80 et 120 et inférieurs à 80. On définit ainsi les valeurs correspondantes des autres critères conformément au schéma indiqué plus loin :

D'une façon générale, les indices de sédimentation et de qualité confirment le classement établi sur la base du W et, à de rares exceptions près, les mêmes blés sont présents à l'intérieur d'un même groupe, quel que soit le mode d'expression de la force.

Il faut toutefois excepter la variété *Jufy* qui, classée en D par le W, se situe en C par l'indice de sédimentation et en B par la qualité protéique. Inversement, la variété *Alba* passe du groupe C au groupe D selon les mêmes critères. Mêmes observations pour *Lichti F 59* qui se classe en A par le W et en B d'après les autres indices.

Le classement établi, en prenant pour base l'indice alvéographique, permet donc de fixer approximativement les valeurs limites des autres critères pour chacune des catégories que l'on a coutume de distinguer.

Ainsi, les blés dits de force, (W > 150) présenteraient un indice de sédimentation supérieur à 31 et une qualité protéique supérieure à 2,5.

Pour les blés faibles (W < 80) les mêmes indices seraient respectivement inférieurs à 17 et à 1,70. Pour ceux des catégories intermédiaires, (W compris entre 80 et 150), les valeurs de sédimentation seraient comprises entre 17 et 31 et la qualité protéique entre 1,7 et 2,5.

Groupe	Nombre d'échantillons	W	S	S/P
A	15	W > 150 350 (*Conley*) à 211 (*Banco*)	S > 31 67 (*Karn II 59*) à 33 (*Lichti F 60*)	S/P > 2,50 4,60 (*Karn II 59*) à 2,62 (*Lichti F 60*)
B	3	150 ⩾ W ⩾ 120 150 (*Taca*) à 137 (*E. Triumph*)	31 ⩾ S ⩾ 25 31 (*Lichti F 59*) à 26 (*E. Triumph*)	2,50 ⩾ S/P ⩾ 2,25 2,40 (*A. Bankut*) à 2,28 (*Lichti F. 59*)
C	5	120 ⩾ W ⩾ 80 108 (*Mara*) à 82 (*Lucas*)	25 ⩾ S ⩾ 17 25 (*Jufy*) à 17 (*Stella 60*)	2,25 > S/P > 1,70 1,98 (*E. Triumph*) à 1,74 (*Stella 59*)
D	5	W < 80 79 (*Jufy*) à 35 (*Omar*)	S < 17 16 (*Stella 59*) à 9 (*Omar*)	S/P ⩽ 1,70 1,70 (*Alba*) à 0,95 (*Omar*)

Un tel classement n'ayant rien de rigide, il s'agit là évidemment de valeurs approchées.

Il faut d'ailleurs noter que les blés étrangers examinés comportent une proportion relativement faible d'échantillons de force moyenne et sont, de ce fait, assez peu représentatifs de notre production nationale.

C'est pour cette raison que notre étude a porté parallèlement sur différentes variétés françaises, et le tableau 2 ci-après rend compte des résultats obtenus à leur sujet.

Un petit nombre seulement des 22 variétés figurant au tableau 2 constitue la majeure partie des surfaces emblavées. Certaines d'entre-elles ne sont pratiquement plus cultivées. Par suite du nombre trop limité des échantillons, nous n'avons pu faire figurer les résultats concernant certains blés de force élevée tels que *Florence Aurore* et *Progress*.

Les valeurs intéressant la teneur en protides, les indices alvéographique et de sédimentation ainsi que la qualité protéique sont des valeurs moyennes, établies pour chaque variété à partir d'un nombre plus ou moins important d'échantillons.

Du point de vue de la teneur en protides, comprise entre 11,10 (*Aisne*) et 13,65 p. 100 (*Magdalena*), ces variétés françaises constituent une gamme beaucoup moins large que les blés étrangers examinés précédemment.

TABLEAU 2

Force et qualité protéique de différentes variétés françaises (récolte 1959)

Variétés	p. 100 des surfaces en blé (1)	Origine (2)	Nombre d'échantillons	Protides blés (% de s.s) Teneur moyenne	Ind. Alvéographique W		Ind. Sédimentation S		Qualité protéique S/Prot. blés	
					moyen (3)	écart type (%)	moyen (3)	écart type (%)	moyen	écart type (%)
Aisne	1,5	*c, d*	4	11,1	131	—	28	—	2,52	—
Alterna		*a, c*	14	12,2	132	32	29,5	17	2,42	15
Ardennes		*a, b*	10	13,6	218,5	31	39,5	23	2,95	20
Artois		*a, c*	8	11,7	192,5	24	30,5	10	2,61	17
Bellevue		*a, c*	15	11,65	95	22	26,5	8	2,26	26
Cappelle	35	*a, b, c*	56	12,25	128,5	19	29	25	2,47	16
Carest		*a, c*	12	12,25	143	21	28	21	2,27	5
Docteur-Mazet	1,5	*a*	5	11,7	141	13	30,5	17	2,56	9
Étoile de Choisy	15	*a, b, c*	27	11,8	77	18	21	22	1,76	22
Gilma		*a, c*	14	12,45	141	8	31,5	21	2,52	21
Heurtebise		*a, c*	11	12,3	97,5	21	20,5	13	1,67	11
Hyb. de *Bersée*		*a, b, c*	11	13,5	84,5	21	25,5	28	1,96	23
Hyb. de *la Noue*		*a, b, c*	12	12,4	151,5	25	33,5	25	2,73	20
Maître-Pierre	3,5	*a, c*	13	12,7	182	31	29	3	2,30	15
Magdalena		*b*	3	13,65	282	—	46	—	3,40	—
Marne	2,5	*a, c*	10	12,7	164,5	29	31	16	2,55	14
Novales		*a*	8	11,75	93,5	23	20	33	1,72	22
Pilote		*a, c*	10	12,45	241	7	36	18	2,87	10
Poncheau	3	*a, c, d*	11	13	265	20	38,5	18	3,05	15
Vaillant		*a, c*	19	12,9	164	37	30	27	2,31	5
Vilmorin 23		*a, b*	15	12,5	62,5	29	15	38	1,40	32
Vilmorin 27	2,5	*a*	24	12,8	122,5	19	28	21	2,20	17

(1) Selon JONARD, INRA (1961)
(2) Stations agronomiques INRA : *a*) Versailles, *b*) Cl -Ferrand, *c*) Dijon, *d*) Colmar
(3) Farines extraites à 67-72 p. 100 (moulin expérimental Bühler)

Il en est de même en ce qui concerne la force dont les valeurs extrêmes, représentées par *Vilmorin 23* et *Magdalena*, sont comprises entre 62 et 282 pour le W, entre 15 et 46 pour l'indice de sédimentation et entre 1,40 et 3,40 pour la qualité protéique.

Si l'on établit un classement de ces variétés analogue au précédent, aux différentes valeurs de W caractérisant chaque groupe correspondent les valeurs de sédimentation et de qualité protéique suivantes :

Groupe	Nombre de variétés	W	S	S/P
A	9	W > 150 282 (*Magdalena*) à 152 (H. *La Noue*)	S > 30 46 (*Magdalena*) à 30,5 (*Artois*)	S/P > 2,50 3,40 (*Magdalena*) à 2,52 (*Aisne, Gilma*)
B	7	150 ⩾ W ⩾ 120 143 (*Carest*) à 122,5 (*Vilm. 27*)	30 ⩾ S ⩾ 26 30 (*Vaillant*) à 26,5 (*Bellevue*)	2,50 ⩾ S/P ⩾ 2,25 2,47 (*Cappelle*) à 2,26 (*Bellevue*)
C	4	120 ⩾ W ⩾ 80 97,5 (*Heurtebise*) à 84,5 (Hyb. *Bersée*)	26 ⩾ S ⩾ 20 25,5 (Hyb. *Bersée*) à 20,5 (*Heurtebise*)	2,25 ⩾ S/P ⩾ 1,70 2,20 (*Vilm. 27*) à 1,72 (*Novales*)
D	2	W < 80 77 (*Et. Choisy*) à 62,5 (*Vilm. 23*)	S ⩽ 20 20 (*Novales*) à 15 (*Vilm. 23*)	S/P < 1,70 1,67 (*Heurtebise*) à 1,40 (*Vilm. 23*)

On constate d'abord que les valeurs limites de S et S/P définies en fonction de l'indice alvéographique sont tout à fait comparables à celles établies à partir des blés étrangers.

Les variétés de force (W > 150) fournissent une valeur de sédimentation supérieure à 30 et un indice de qualité supérieur à 2,5 (limites pour les blés étrangers 31 et 2,5).

Pour les variétés faibles (W < 80), ces critères sont respectivement inférieurs à 20 et à 1,70, (blés étrangers 17 et 1,70). Quant aux variétés de force intermédiaire (W compris entre 80 et 150), l'indice de sédimentation a pour limites 20 et 30 (17 et 31 avec les blés étrangers) et l'indice de qualité 1,70 et 2,50 (valeurs identiques à celles des blés étrangers).

Cette concordance par groupe entre les valeurs alvéographiques et celles des autres critères est d'autant plus significative qu'il s'agit pour les blés étrangers d'échantillons uniques alors que les valeurs concernant les blés français sont des moyennes établies pour chaque variété sur des échantillons d'origine différente.

A quelques exceptions près, les mêmes variétés se retrouvent à l'intérieur d'un même groupe, quel que soit le mode d'expression de la force utilisée. *Étoile de Choisy*

par exemple, classé dans le groupe D par son W, se situe dans le groupe C par les 2 autres critères, mais les différences sont peu significatives pour les blés de force inférieure.

Il en va différemment pour les blés de force élevée. C'est ainsi que *Dr-Mazet*, situé dans le groupe B par son W, se classe nettement parmi les variétés du groupe A d'après les indices de sédimentation et de qualité. A l'inverse, *Maître-Pierre* et *Vaillant*, classés parmi les blés de force (groupe A) selon l'indice alvéographique, se rangent dans le groupe B en fonction des 2 autres critères.

3. — Corrélations entre différents critères d'appréciation de la force

Nous avons cherché à préciser les observations précédentes en déterminant, à l'aide du calcul statistique, le degré d'interdépendance des différents critères de force examinés, exprimé par les coefficients de corrélation correspondants.

Les diagrammes de la figure 1 concernent 38 variétés différentes de la récolte 1959 représentées par un total de 364 échantillons. Il s'agit des diagrammes de dispersion relatifs aux indices de sédimentation d'une part, de qualité protéique d'autre part, en fonction des indices alvéographiques. Chaque point des 38 couples de valeurs a pour coordonnées les indices moyens correspondant à une même variété et calculés à partir d'un nombre plus ou moins important d'échantillons.

Bien que le nombre de couples d'observations soit limité, la valeur des coefficients établis témoigne que, positives dans les 2 cas, les corrélations sont élevées et significatives.

Ces observations se sont trouvées confirmées en calculant de la même façon les coefficients de corrélation relatifs aux 31 blés étrangers examinés précédemment et à 4 lots d'hybrides d'origine et de récoltes différentes représentant un total d'environ 500 échantillons.

Le tableau 3 suivant indique les valeurs des coefficients de corrélation ainsi établis avec les intervalles de confiance correspondants.

On peut constater que la corrélation reliant les valeurs de sédimentation aux données de l'alvéographe est élevée dans tous les cas, la valeur des coefficients s'établissant aux alentours de + 0,80 si l'on excepte les hybrides du lot *b*. Il n'est pas inutile de souligner que la corrélation relative aux variétés françaises, établie à partir des indices moyens de chaque variété, est du même ordre que celles concernant les blés hybrides et étrangers, calculées à partir des données analytiques intéressant individuellement chaque échantillon. La signification des corrélations mises en évidence est donc certaine.

Il n'apparaît pas, d'autre part, que le degré d'interdépendance entre les 2 critères soit influencé de façon significative ni par le passé agronomique des échantillons (lieu de culture et année de récolte) ni par les conditions d'extraction des farines expérimentales.

Enfin, ces résultats confirment tout à fait les conclusions de deux travaux récents. A partir de farines industrielles ou expérimentales provenant de blés indigènes ou importés, Maes (1962) en Belgique a établi de même une corrélation élevée ($r = + 0{,}85$) entre les valeurs de sédimentation et les indices alvéographiques.

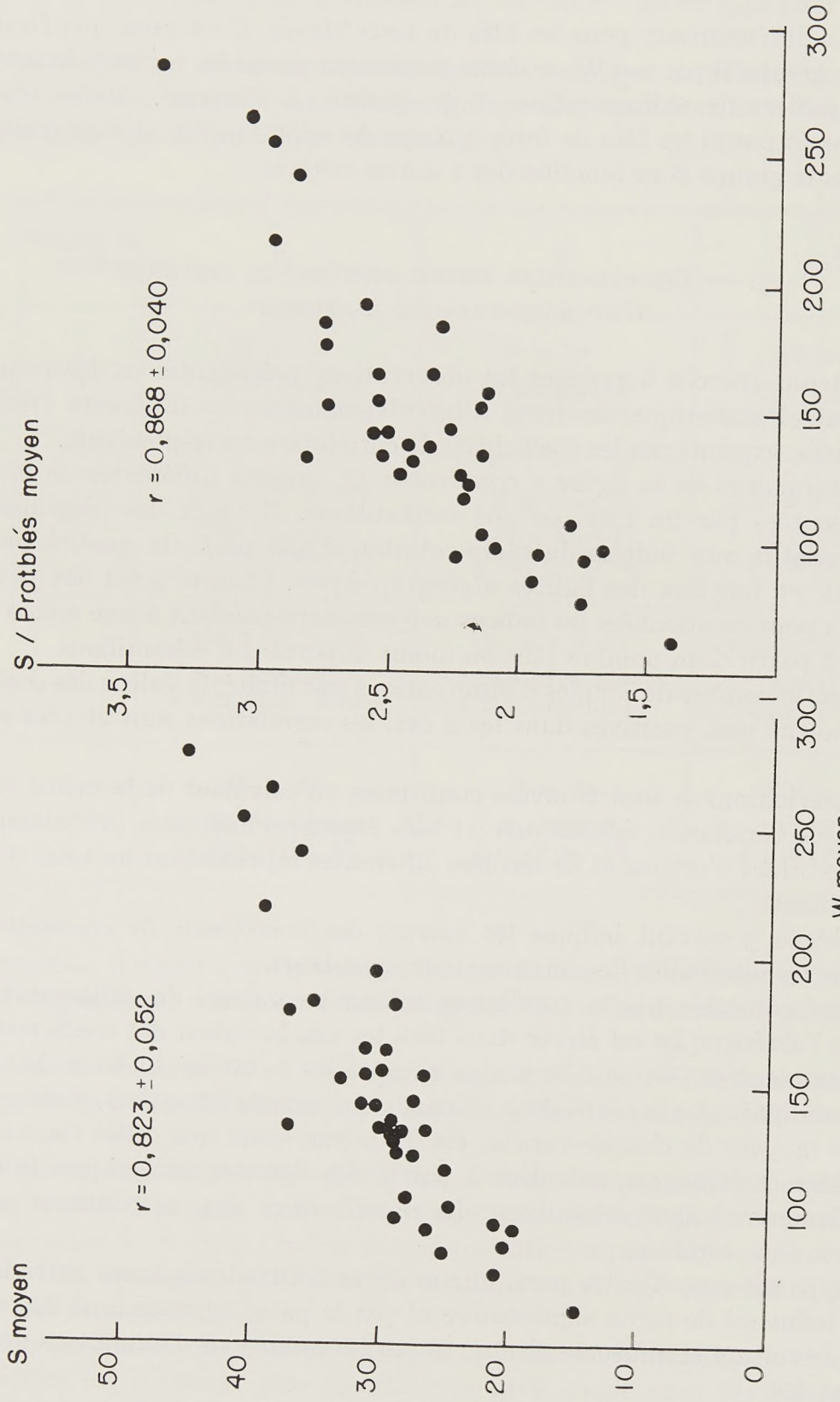

S moyen
r = 0,823 ± 0,052
W moyen
S / Protblés moyen
r = 0,868 ± 0,040
W moyen

FIG. — 1.

Faisant état d'une étude similaire de la « Great Plain Wheats » sur 387 échantillons de blés américains, ZELENY (1962) a indiqué de son côté un coefficient de corrélation de + 0,87.

Les résultats du tableau 3 montrent également que les corrélations reliant les indices de qualité protéique aux valeurs de W sont elles-mêmes élevées et significatives, la valeur moyenne des coefficients, voisine de + 0,80, étant sensiblement la même que précédemment.

TABLEAU 3

Cœfficients de corrélation, Indice de sédimentation qualité protéique et Alvéogramme

Blés	Récolte	Origine	Nombre d'échantillons	S⟷W (*r*)	S/Prot. blés⟷W (*r*)
Étrangers	1958 à 1961	Europe-USA	31	+ 0,824 ± 0,055	+ 0,778 ± 0,068
Français Variétés cultivées	1959	INRA	364	+ 0,823 ± 0,052	+ 0,868 ± 0,040
Hybrides en cours d'étude	1959 *a*	Versailles	202	+ 0,800 ± 0,025	
	1959 *b*	Versailles Dijon	70 / 30 = 100	+ 0,744 ± 0,044	+ 0,785 ± 0,038
	1959 *c*	Versailles Dijon	40 / 41 = 81 (1)	+ 0,820 ± 0,036	+ 0,780 ± 0,043
	1960	Versailles Dijon	80 / 27 = 107	+ 0,790 ± 0,036	+ 0,832 ± 0,031

(1) Farines extraites à 50-55 %. Pour tous les autres blés, extraction 67-72 %.

Ainsi, les 2 critères d'appréciation de la force exprimant soit spécifiquement soit globalement les caractéristiques de quantité et de qualité des protéines du blé, présentent l'un et l'autre une corrélation étroite avec le critère classique chiffrant les propriétés physiques des pâtes.

4 . — VARIABILITÉ DES CRITÈRES D'APPRÉCIATION DE LA FORCE

Pour chacune des variétés figurant dans le tableau 2, les valeurs exprimant respectivement les indices alvéographiques, de sédimentation ou de qualité protéique sont des moyennes calculées à partir d'un certain nombre de données expérimentales.

Ces valeurs fournies par l'analyse présentent, pour chacun des critères examinés, et par rapport aux moyennes indiquées, une variabilité plus ou moins importante.

Pour chaque détermination, et sous réserve d'un nombre de données suffisant, le calcul de l'écart type a permis de préciser dans quelle mesure les résultats expérimentaux étaient groupés autour de la moyenne. Le calcul des coefficients de variation (écart type p. 100 de la moyenne) nous a permis d'autre part de comparer la variabilité des différents critères utilisés.

Pour les indices alvéographiques et de sédimentation, on constate que dans 11 cas sur 20 les coefficients de variation de S sont inférieurs à ceux de W. La variabilité des 2 critères semble donc être sensiblement la même.

Si l'on compare les indices alvéographiques et de qualité protéique, on observe que, dans 14 cas sur 20, la variabilité des indices de qualité est plus faible que celle des W. Il semblerait donc que la qualité protéique constitue un critère moins fluctuant que les valeurs alvéographiques. On constate de même que, dans 16 cas sur 20, la variabilité des indices de qualité protéique est inférieure à celle des indices de sédimentation.

Ainsi, la qualité protéique semble donner de la force des échantillons une expression apparemment moins fluctuante que les autres critères étudiés. C'est également la notion qui peut être dégagée des résultats publiés récemment par HALTON et *coll.* (1961) au terme d'une étude intéressant différents blés « hard » d'hiver. Visant à préciser l'influence des conditions de préparation des farines expérimentales sur les valeurs de sédimentation, ces auteurs ont étudié comparativement les farines obtenues au moulin automatique Bühler (taux d'extraction voisin de 70 p. 100) et celles extraites au moulin Weston-Tag (taux d'extraction 12,5 p. 100 environ) selon la technique codifiée par ZELENY.

Cette disparité dans les conditions expérimentales se traduit par une variation importante de la teneur en protéines et des indices de sédimentation des farines extraites d'un même blé. Mais si on détermine les rapports S/P à partir de ces données on constate, ainsi qu'en témoignent les valeurs ci-dessous, que les indices de qualité protéique accusent des variations beaucoup plus réduites.

Echant. N°	Protéines farine % (à 14 % d'humidité)		Indice de sédimentation (à 14 % d'humidité)			Qualité protéique S/P farines		
	Tag	Bühler	Tag	Bühler	Variation %	Tag	Bühler	Variation %
6	14,2	12,3	64	52	± 10	4,50	4,25	± 2,9
1	13,5	11,9	54	42	± 12,5	4	3,55	± 5,8
12	13,5	11,8	61	47	± 13	4,52	4	± 6,1
7	13	12,3	46	42	± 4,5	3,55	3,42	± 1,7
5	12,9	11,5	61	49	± 11	4,73	4,25	± 5,3
4	12,3	11,1	54	46	± 8	4,40	4,15	± 2,8

En ce qui concerne les valeurs de qualité protéique des variétés que nous avons étudiées, il est donc peu probable que les variabilités observées soient uniquement d'origine expérimentale, puisque les différents échantillons d'une même variété ont été soumis à des conditions de mouture identiques.

Le même raisonnement s'applique d'ailleurs aux indices alvéographiques et de sédimentation, car les erreurs de nature expérimentale que comportent normalement ces méthodes ne suffisent pas à rendre compte des variations constatées. C'est donc principalement à l'origine culturale des différents échantillons d'une même variété qu'il faut attribuer la variabilité des critères étudiés.

De ce point de vue, le critère « qualité protéique », apparaît moins influencé par les facteurs du milieu que les indices de sédimentation et alvéographiques et, à cet égard, semble fournir de la force variétale des blés une expression plus spécifique.

5 . — Relations entre la force des blés et leur teneur en protéines

Des observations d'un autre ordre peuvent être faites à partir des résultats exposés dans les tableaux 1 et 2.

Bien que de teneur en protéines équivalentes, certaines variétés manifestent des forces très inégales, quel qu'en soit le mode d'expression.

En voici des exemples :

Variétés étrangères					Variétés françaises				
Protéines %	Variétés	W	S	S/P	Protéines %	Variétés	W	S	S/P
10,4	*San Pastore*	43	12	1,15	11,70	*Bellevue*	95	26,5	2,26
	Taca	150	28	2,69		*Artois*	192	30,5	2,61
11,35	*Stella 60*	76	17	1,50	12,45 à 12,80	*Vilm. 27*	62,5	15	1,40
	Lichti F 58	286	36	3,16		*Gilma*	141	31,5	2,52
						Pilote	241	36	2,87
13,15	*E. Triumph*	137	26	1,98	13,50 à 13,65	Hyb. *Bersée*	84,5	25,5	1,96
	Karn 60	216	52	3,94		*Ardennes*	218,5	39,5	2,95
						Magdalena	282	46	3,40
15,60	*A. Bankut*	148	38	2,40					
	Record 60	298	51	3,31					

Dans le cas particulier des exemples ci-dessus, on peut observer qu'à une même teneur en protéines, les indices alvéographiques et de sédimentation évoluent parallèlement à l'indice de qualité protéique, témoignant qu'ils constituent bien ainsi une expression de cette qualité.

Certains travaux ont déjà signalé que l'indice de sédimentation pouvait, dans certains cas, refléter directement la qualité des protéines d'un blé. Fajersson (1962) a indiqué de ce point de vue qu'à une même teneur en protéines pouvaient correspondre des indices de sédimentation très différents et indique des valeurs comprises entre 42 et 72 pour des blés à 14,5 p. 100 de protéines, entre 42 et 68 pour des blés à 16,5 p. 100. Mattern et Eastin (1962) ont observé de même qu'à teneur égale en protéines certains blés du Nébraska présentaient des indices de sédimentation plus élevés que d'autres.

On trouve également dans les résultats que nous avons obtenus, d'autres exem-

ples montrant qu'à des qualités protéiques équivalentes peuvent correspondre des teneurs en protéines parfois très différentes ainsi que l'indiquent les valeurs suivantes :

Variétés étrangères					Variétés françaises				
Qualité	Protéines %	Variétés	S	W	Qualité	Protéines %	Variétés	S	W
1,98	11,6	*Mara*	23	108	2,26	11,65	*Bellevue*	26,5	95
	13,1	*E. Triumph*	26	137		12,25	*Carest*	28	143
2,70	10,4	*Taca*	28	150	2,52	11,10	*Aisne*	28	131
	17,6	*Selkirk*	48	275		12,45	*Gilma*	31,5	141
3,30	15,4	*Record 60*	51	298	2,56	11,70	*Dr. Mazet*	30,5	141
	17,1	*Conley*	56	350		12,70	*Marne*	31	164

Dans le cas des exemples rapportés, les indices alvéographiques et de sédimentation sont presque toujours de valeur différente pour une même qualité protéique et, d'une façon générale, évoluent parallèlement à la teneur en protéines. Il n'est donc pas douteux que, pour les blés considérés, ils subissent l'un et l'autre l'influence prédominante du taux de protéines.

Le fait a été amplement démontré en ce qui concerne l'indice de sédimentation, et nous avons récemment exposé dans leurs détails les nombreux travaux qui ont mis en évidence des corrélations élevées entre la teneur en protéines et les valeurs de sédimentation (BOURDET, 1963). Au terme d'une étude portant sur plus de 100 échantillons, MAES (1962) a, de la même façon, admis que les valeurs alvéographiques étaient fortement influencées par la teneur en protéines.

Il apparaît donc que les indices alvéographiques et de sédimentation sont l'un et l'autre sous la dépendance conjointe de la quantité et de la qualité des protéines du blé et que, selon les cas, ils peuvent refléter préférentiellement l'un ou l'autre de ces 2 facteurs associés.

Mais ces conclusions s'appliquent soit à des échantillons uniques de variétés différentes (blés étrangers) soit à des variétés dont les critères de force et les teneurs en protéines sont des valeurs moyennes établies à partir d'un nombre plus ou moins important d'échantillons d'origine diverse.

Nous avons donc tenté de préciser, à l'échelon variétal, l'influence exercée par la teneur en protéines sur la valeur de chacun des critères exprimant la force.

Les diagrammes de la figure 2 rendent compte des observations effectuées en ce sens sur 8 variétés françaises et traduisent, pour chacune d'entre elles, l'évolution respective des indices alvéographiques de sédimentation et de qualité protéique en fonction de la teneur du grain en protéines totales.

Pour faciliter la comparaison entre les variétés et les différentes valeurs exprimant leur force, chacun des 3 critères utilisés a été exprimé en p. 100 de sa valeur maximum ; pour chaque variété, ces valeurs maximum ont été indiquées en regard des diagrammes correspondants.

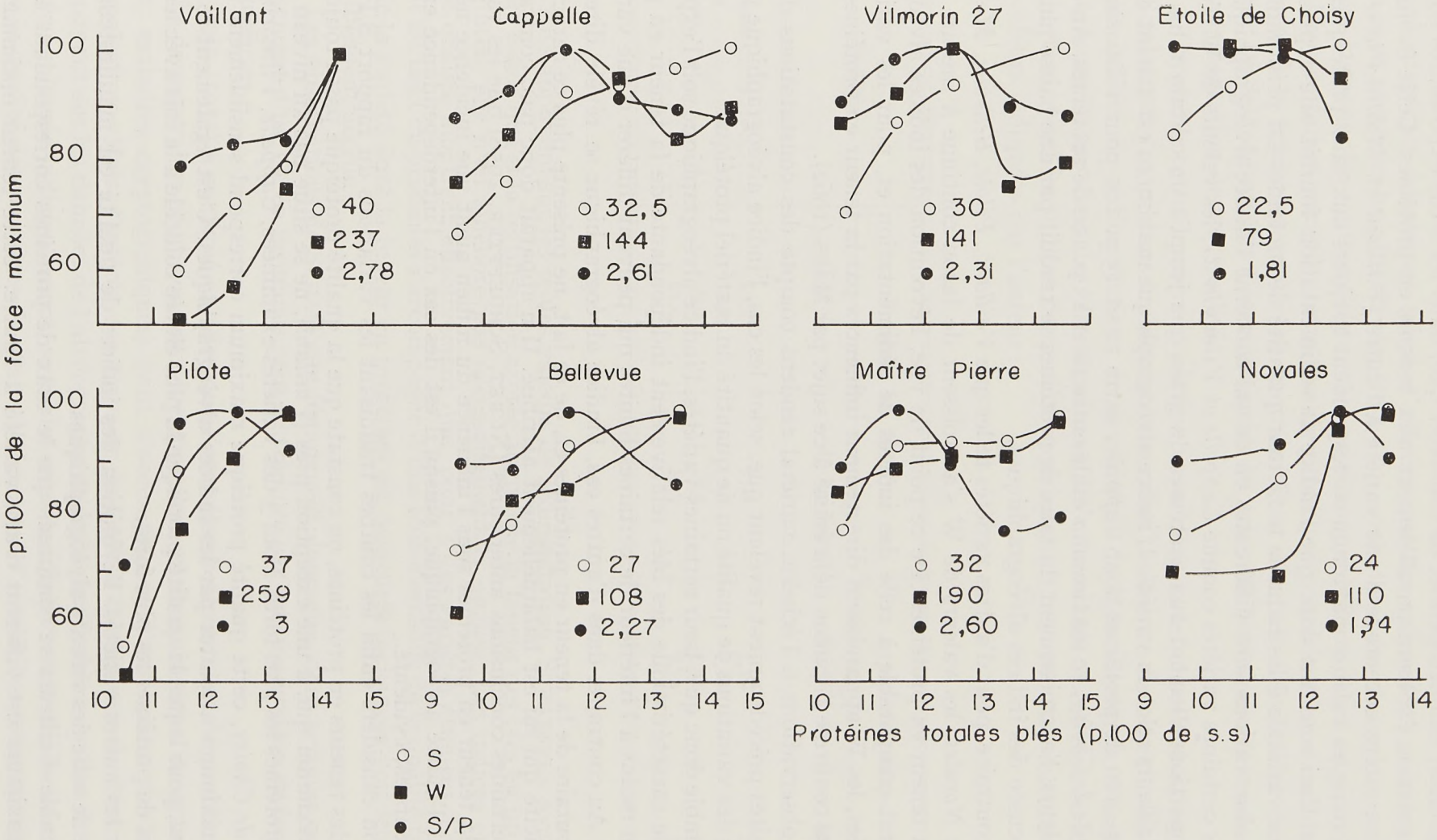


FIG. 2 — *Évolution de différents critères de la force variétale en fonction de la teneur du grain en protéines totales*

Un premier examen permet de constater que, dans les 8 cas exposés, les indices de sédimentation évoluent parallèlement aux teneurs en protéines. Cette évolution est plus ou moins accentuée d'une variété à l'autre (*Vaillant* et *Maître-Pierre* par exemple) mais les valeurs maximum correspondent toujours aux taux protéiques les plus forts. Ceci confirme donc que l'indice de sédimentation fournit une expression de la force variétale dans laquelle le facteur quantité de protéines est prédominant.

Les observations sont différentes en ce qui concerne l'indice alvéographique.

Pour certaines variétés comme *Cappelle* et *Vilmorin 27*, les valeurs de W n'évoluent proportionnellement aux protéines du grain que jusqu'à un certain taux, qui diffère d'ailleurs selon la variété. L'indice alvéographique maximum est atteint entre 11 et 12 p. 100 de protéines pour *Cappelle*, entre 12 et 13 p. 100 pour *Vilmorin 27*. Avec *Étoile de Choisy*, ce maximum s'étale entre 10 et 13 p. 100 de protéines. Au-delà de ces valeurs, l'accroissement du taux de protéines se traduit par une baisse plus ou moins accusée des indices alvéographiques.

Au contraire, pour d'autres variétés telles que *Vaillant*, *Pilote*, *Bellevue*, *Maître-Pierre* et *Novales*, les valeurs de W s'accroissent de façon continue à mesure que s'élève la teneur en protéines. De ce point de vue, l'évolution des indices alvéographiques est comparable à celle des indices de sédimentation et, pour les variétés considérées, les W apparaissent directement influencés par la teneur en protéines du blé, ce qui confirme l'opinion déjà émise à ce sujet par Maes (1962).

Ces observations à l'échelon variétal rendent compte des constatations d'ensemble faites précédemment révélant que, selon les cas, l'indice alvéographique peut exprimer des variations de qualité ou de quantité du matériel protéique.

Il semble donc que, pour certaines variétés, l'indice alvéographique soit l'expression d'une caractéristique des blés relativement indépendante de la teneur en protéines, du moins à l'intérieur de certaines limites qui peuvent différer d'une variété à l'autre. Au contraire, dans d'autres cas, l'indice alvéographique se révèle directement tributaire de la teneur en protéines et, de ce fait, ne présente plus ce caractère de spécificité qui lui est habituellement attribué. Il n'apparaît donc pas, contrairement à certaines conclusions antérieures (Nuret, Schoeffter, 1958) que les variations de la teneur en protéines sous l'influence du milieu aient une incidence négligeable sur l'indice alvéographique, puisqu'il est des cas où l'interdépendance entre les 2 facteurs est évidente.

Si l'on considère enfin les courbes traduisant les variations du rapport S/P en fonction des teneurs en protéines, on constate que la qualité protéique passe toujours par un maximum qui, à une exception près (*Vaillant*), ne se situe pas au niveau des taux de protéines les plus forts. Pour 3 des variétés examinées, *Cappelle*, *Vilmorin 27* et *Étoile de Choisy*, cette qualité protéique maximum correspond sensiblement aux valeurs maximum atteintes par les indices alvéographiques. C'est également le cas de *Vaillant*, pour lequel la qualité protéique la plus élevée coïncide à la fois avec les W et les taux de protéines les plus forts.

Pour les autres variétés, l'évolution des indices de qualité est manifestement différente de celle des valeurs alvéographiques.

Il semble d'ailleurs se confirmer que le taux de protéines correspondant à la qualité maximum est différent d'une variété à l'autre. Cette teneur optimum en protéines serait comprise entre 10 et 12 p. 100 pour *Étoile de Choisy*, de 11 à 12 p. 100 pour *Bellevue*, *Cappelle* et *Maître-Pierre*, de 11,5 à 12, 5 p. 100 pour *Pilote*, de 12 à

13 p. 100 pour *Vilmorin 27* et *Novales. Vaillant* est la seule variété pour laquelle la qualité protéique maximum (ainsi d'ailleurs que les valeurs W), correspond aux teneurs en protéines les plus élevées (14 à 15 p. 100) ; mais des observations similaires ont été faites sur les varités *Gilma* (14 à 15 p. 100) et *Alterna* (13 à 14 p. 100).

Chez certaines variétés, cette qualité protéique pourrait donc s'accroître parallèlement à la teneur en protéines du grain. Pour d'autres, il existerait des teneurs limites au-delà desquelles l'accroissement du taux de protéines n'entraînerait pas une augmentation de leur qualité.

A l'appui de cette dernière hypothèse, nous citerons les observations rassemblées par SCHAEFFER (1957) dans une étude concernant l'influence de la fertilisation azotée sur les indices de sédimentations de 4 varitétés de blés allemands. Parallèlement aux teneurs en protéines des blés témoins et des mêmes blés ayant reçu 80 kg d'azote par hectare, voici les indices de qualité protéique qui peuvent être calculés à partir des valeurs indiquées par l'auteur :

Variétés	Protéines blé % (P)		Qualité protéique (S/P)	
	Témoin	+ 80 kg N/ha	Témoin	+ 80 kg N/ha
Criewener	10,6	11,8	1,16	0,91
Werla	9,3	13,8	1,69	1,42
Carstens	9,7	9,6	1,97	2,94
Taca	11,6	13,9	2,70	2,16

En s'appuyant sur les seules valeurs de sédimentation, SCHAEFFER avait conclu de ces essais que si la fertilisation azotée augmente la teneur des blés en protéines et en gluten, elle n'en améliore pas nécessairement la qualité. Les indices exprimant cette qualité montrent effectivement que, pour 3 des variétés étudiées, l'accroissement du taux de protéines s'accompagne d'une baisse sensible de la qualité protéique. Seule la variété dont la teneur en protéines est demeurée inchangée voit leur qualité sensiblement accrue.

Les observations de SCHAEFFER témoignent donc que, dans certains cas, l'enrichissement d'un blé en protéines peut se traduire par une diminution de leur qualité intrinsèque.

COÏC (1953) a souligné en effet que l'accroissement du taux de protéines consécutif à de mauvaises conditions de développement ou de maturation du grain (échaudage, maladies cryptogamiques) peut s'accompagner d'une baisse de la qualité technologique. Mais, l'intérêt des travaux de COÏC a été surtout de démontrer, en s'appuyant sur les données de l'alvéographe et de la panification, qu'une fertilisation azotée appliquée judicieusement, se traduisait à la fois par un accroissement du taux et de la qualité des protéines du grain. Voici, selon l'auteur, les teneurs en protéines totales et les indices alvéographiques de différentes variétés ayant reçu, en plus de la fertilisation précoce appliquée à raison de 50 à 70 kg d'azote par hectare (échantil-

lons témoins), une fertilisation azotée semi tardive et tardive (50 à 60 kg d'azote par hectare) :

Variétés	Protéines blé %		Indices algéographiques	
	témoin	+ N	témoin	+ N
Vilmorin 27	9,2	11,9	97	150
Yga	9,9	12,7	105	134
	8,7	11,1	96	130
Hyb. de *Bersée*	9,1	11,5	45	63
	7,8	10,4	45	65
Hyb. *40*	9,6	12,7	80	100
	8,3	10,8	65	94

Même si l'on considère que le taux en protéines relativement bas des variétés examinées les a rendues particulièrement « réceptives » à un apport azoté, les valeurs précédentes soulignent suffisamment l'importance des modifications observées.

Bien que, dans les 2 études citées, l'appréciation de la qualité protéique soit fondée sur des critères de principe différent, il y a opposition entre les faits mis en évidence de part et d'autre. Or, cette opposition peut n'être qu'apparente si l'on admet, comme nos résultats semblent le montrer, que la qualité du matériel protéique du grain n'est pas influencée par sa quantité de façon identique pour toutes les variétés. Alors que pour certaines, les 2 facteurs semblent évoluer de façon sensiblement parallèle, pour d'autres il existerait une teneur optimum en protéines, différente selon les variétés, à laquelle correspondrait une qualité protéique maximum. Ainsi pourrait-on expliquer que l'accroissement du taux de protéines consécutif à une fertilisation azotée pourrait, selon les cas, se traduire par une amélioration ou un amoindrissement de la qualité intrinsèque du gluten.

IV. — CONCLUSIONS

Exprimant simultanément les caractéristiques quantitatives et qualitatives du matériel protéique du blé, l'indice de sédimentation constitue une méthode intéressante d'appréciation de la force des blés aux stades de la commercialisation et de l'utilisation. Mais, du fait qu'il est plus particulièrement tributaire de la teneur en protéines, il ne peut fournir à lui seul, en sélection, une expresion suffisamment spécifique de la force des variétés.

Il semble par contre que l'indice de qualité protéique, établi à partir des valeurs de sédimentation et des teneurs en protéines du grain, soit susceptible d'exprimer une caractéristique de la force des blés plus spécifiquement variétale.

Statistiquement, l'indice alvéographique présente, avec les 2 critères précédents, une corrélation élevée témoignant qu'il est sous la dépendance conjointe du taux et de la qualité des protéines. Lorsque les observations sont faites à l'échelon variétal, on constate que, dans certains cas, l'indice alvéographique reflète directement les variations du taux de protéines alors que dans d'autres, il semble exprimer préférentiellement la qualité intrinsèque de ces protéines.

Du point de vue de la technologie boulangère, ces constatations permettraient peut-être d'expliquer que les caractéristiques de force d'un blé, définies par la seule valeur W, ne sont pas toujours en accord avec les résultats obtenus pratiquement. Il est d'ailleurs fréquent d'attribuer à la composante du diagramme alvéographique exprimant le gonflement une importance au moins égale à celle de l'indice lui-même : des blés à W élevé mais à faible gonflement peuvent se révéler médiocres en panification alors que d'autres, à W moins important mais à gonflement élevé, manifestent des aptitudes intéressantes.

Or, tel qu'il a été défini par ZELENY et tel que nous l'avons utilisé dans cette étude, l'indice de qualité protéique n'exprime pas autre chose que les propriétés spécifiques d'hydratation et de gonflement des protéines dont dépendent en définitive les caractéristiques technologiques des différentes variétés.

Apparemment moins sensible que les autres critères aux facteurs du milieu, l'indice de qualité protéique semble donc constituer, du point de vue génétique, un critère à la fois plus constant et plus spécifique de la force variétale.

Du point de vue agronomique, il serait d'autre part souhaitable de préciser le comportement des principales variétés actuellement cultivées vis-à-vis des facteurs du milieu susceptibles de modifier leur teneur en protéines si, comme semblent l'indiquer certains des résultats obtenus, l'influence exercée par cette teneur sur la qualité protéique elle-même n'est pas identique pour toutes les variétés.

Il s'agirait d'abord, pour chacune, de définir le taux protéique correspondant à la qualité maximum puis de concrétiser les renseignements ainsi rassemblés par des essais pratiques de cuisson. Les résultats obtenus devraient alors permettre d'orien ter les conditions culturales dans le sens le plus favorable.

Une meilleure connaissance de la qualité intrinsèque des protéines du gluten et des différents facteurs qui la conditionnent devrait contribuer, du double point de vue génétique et agronomique, à l'amélioration de la qualité technologique de nos récoltes.

C'est du moins dans cette optique que nous nous proposons de poursuivre nos travaux, dont l'étude qui vient d'être exposée ne constituait qu'une étape préliminaire.

Reçu pour publication en juin 1963.

SUMMARY

PROTEIN QUALITY AND STRENGTH OF WHEAT

The strength of some 900 samples of wheat from different areas and crops, consisting of French and foreign varieties and of hybrids still under selection, had been determined according to 3 criteria : alveographic, sedimentation and protein quality values.

Protein quality, assessed in terms of sedimentation value and total wheat protein content, reflected the hydration and swelling properties of the gluten proteins in an acid medium.

Statistical interpretation of experimental results revealed that alveographic values were highly and significantly correlated with each of the other 2 criteria. Study of varietal wheat strength confirmed that alveographic values can express, according to samples, qualitative and quantitative variations of wheat protein material and demonstrates that alveograms do not always give a specific expression of varietal strength.

In comparison with the other 2 criteria, the protein quality index was less variable, a fact which seemed to suggest a more restricted susceptibility to environmental factors and to indicate a characteristic of wheat more specifically varietal.

Protein quality was not influenced in the same way in all varieties by variations of the total protein content. In some varieties, quality seemed to vary parallely with quantity; in others, there would be an optimum protein content at which gluten quality would reach its highest level. In the latter case, optimum quality did not necessarily correspond with the highest protein content, and was found to vary with different varieties.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BELDEROK B., MEPPELINK E. K., DE RUITER D., 1960. Methoden ter bepaling van de bakkwaliteit van kleine monsters tarwe. *Nederlands graan Centrum, Wageningen.*

BERLINER E., et KOOPMAN J., 1929. Über die Kleberbestimmung in Weizenmehlen. *Z. ges. Mühlenw.*, **6**, 33.

BOURDET A., 1963. Une méthode simple et rapide d'appréciation de la force des blés et des farines : l'essai de sédimentation. État actuel des travaux. Résultats préliminaires sur différentes variétés françaises et européennes. *Meunerie Française*, n° 190-191.

COÏC Y., 1953. La nutrition et la fertilisation azotée du blé d'hiver. *Bull. Engrais*, février-avril.

COÏC Y., ALEXINSKI W., 1953.La fertilisation azotée semi tardive du blé d'hiver II. Action sur le taux d'azote du grain et sa qualité meunière-boulangère. *C. R. Acad. Agric.*, **39**, 782.

FAJERSSON F., 1962. Studien über Beziehungen zwischen verschiednen Qualitätseigen Schaffer bei Weizen mit besonderer Berück sichtigung der sorten und Jahrgangser fekte. *Getreide und Mehl*, **12**, 13.

HALTON P., BAKER G. J., JONES C. R., 1961. An examination of the sedimentation test applied as a measure of the loaf volume and of protein content of US Hard Winter wheat. *Milling*, **137**, 674-676.

MAES E., 1962. Mehleiweisslöslichkeit und Back qualität. I der Sedimentationswert nach ZELENY. *Getreide und Mehl*, **12**, 1-3.

MATTERN P. J., EASTIN J. D., 1962. Nebraska wheats evaluated with the sedimentation test. *Cereal. Sc. To Day*, **7**, 278-84.

NURET H., SCHOEFFTER J., 1958. Considérations sur les blés français. *Bull. E. F. M.*, **166**, 153-166.

PINCKNEY A. J., GREENAWAY W. T., ZELENY L., 1957. Further development in the sedimentation test for wheat quality. *Cereal Chem.*, **34**, 16-25.

SCHAEFER W., 1957. The ZELENY sedimentation test applied to german wheats. *Cereal Sc. To Day*, **2**, 16 19-

ZELENY L., 1947. A simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem.*, **34**, 465-475.

ZELENY L., GREENAWAY W. T., GURNEY G. M., FIFIELD C. C., LESBOCK K., 1960. Sedimentation value as an index of dough mixing characteristics in early generation wheat selections. *Cereal Chem.*, **37**, 673-682.

ZELENY L., 1962. The wheat sedimentation test. *Cereal Sc. To Day*, **7**, 226.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 67-75

ÉTUDE DU DOSAGE DES TOCOPHÉROLS TOTAUX. APPLICATION A L'HUILE DE PÉPINS DE RAISIN

M. FLANZY et P. DUBOIS

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Après une étude du dosage des tocophérols totaux, les auteurs précisent le mode opératoire qu'ils ont appliqué aux huiles de pépins de raisin.

I. — INTRODUCTION

Les tocophérols de l'huile de pépins de raisin ont été étudiés par SILVESTRE : il indique des teneurs variables, pouvant aller de zéro pour les huiles industrielles très oxydées, à 2,6 g/kg pour l'huile de *Mauzac blanc* (cépage de *Vitis vinifera*). Il signale le résultat d'analyses effectuées par Mlle QUAIFE, des « Distillations Products Industries » : elle y démontre la présence dans l'huile de pépins de raisin des tocophérols α, γ, et δ.

Rappelons que les tocophérols (ou vitamine E) sont des constituants de l'insaponifiable des extraits lipidiques végétaux et animaux.

Par ailleurs, l'huile de pépins de raisin a une teneur assez constante en acide linoléique (65 à 70 p. 100 des acides gras de l'huile), selon les analyses effectuées sur des huiles non oxydées par J. FLANZY et M.FLANZY (1959) ; A. PRÉVOT et F. CABEZA (1962).

Le dosage des tocophérols totaux est basé sur leurs propriétés réductrices. Les huiles végétales contenant d'autres corps réducteurs, il est nécessaire d'effectuer une séparation préalable.

1) *Isolement des tocophérols*

La chromatographie en solution benzénique de l'insaponifiable de l'huile sur colonne de terre à foulon spéciale, est la technique la plus utilisée, selon PAQUOT C. et *al* (1962).

La saponification permet d'émiliner les glycérides, les acides gras et les phospholipides.

Mais au cours de cette opération, et surtout au cours de l'extraction de l'insaponifiable, des pertes importantes ont généralement lieu par oxydation, du fait de l'alcalinité du milieu. Toujours selon PAQUOT C. et *al* (1962), des récupérations de 95 p. 100 sont possibles, si on prend certaines précautions : travailler sous azote et en lumière artificielle peu intense, notamment. L'insaponifiable extrait à l'éther éthylique, est repris par du benzène, puis passé sur colonne de terre à foulon en vue de l'adsorption des carotènes et des stérols. Seuls sont alors élués les tocophérols.

MEUNIER A. et VINET P. (1942) avaient proposé, pour les huiles riches en tocophérols une chromatographie directe de l'huile sur le même adsorbant. Les produits élués sont alors les glycérides et les tocophérols. Ainsi, évitait-on les pertes par saponification.

2) *Dosage proprement dit*

La technique la plus utilisée est celle d'EMMERIE-ENGEL (1938), modifiée par le Comité des Méthodes Analytiques de la « Vitamin E Panel Society » (1959), et rapportée par PAQUOT C. et *al.* (1962).

Les tocophérols réduisent le chlorure ferrique, et les ions ferreux sont complexés par l'$\alpha\alpha'$-dipyridyle en solution alcoolbenzénique. La densité optique de ce complexe est mesurée à 520 mμ, deux minutes après l'addition du chlorure ferrique, car alors les coefficients d'extinction relatifs aux différents isomères sont du même ordre de grandeur.

Selon KAUNITZ et BEAVER (1944) les glycérides atténuent la densité optique du complexe ions ferreux — $\alpha\alpha.'$-dipyridyle proportionnellement à la teneur en glycérides d'une part, d'autre part à la densité optique elle-même.

Le réactif proposé par MEUNIER et VINET (1941) est moins utilisé. Il est basé sur la propriété des tocophérols de réduire de façon quantitative et en moins de 15 secondes, le ferricyanure ferrique en bleu de Turnbull. La réaction est suivie au photocolorimètre muni de son écran de 600 mμ et la courbe des absorptions obtenue en fonction du temps permet de faire une correction géométrique en vue de tenir compte de la réduction photochimique du réactif, ainsi que de sa réduction par les carotènes et par certains stérols polyinsaturés.

SILVESTRE (1953) a appliqué cette technique au dosage des tocophérols totaux dans les huiles de pépins de raisin, mais sans saponification ni chromatographie préalable. Or, selon MEUNIER et VINET, (1942), les phospho-amino-lipides réduisent le ferricyanure ferrique sensiblement à la même vitesse que les tocophérols.

Compte tenu de ce qui précède, nos recherches ont porté sur une méthode qui consisterait à chromatographier directement l'huile comme l'indiquaient MEUNIER et VINET, à effectuer le dosage par le réactif d'EMMERIE-ENGEL, et enfin à corriger l'atténuation due aux glycérides.

II. — ÉTUDE D'UNE NOUVELLE MÉTHODE

1) Méthode proposée

a) *Matériel*

En dehors du matériel courant, il est nécessaire de disposer d'une colonne à chromatographie de 200 mm de haut et 17 mm de diamètre, munie d'un robinet, et d'un système permettant d'appliquer en tête de colonne une légère surpression de gaz carbonique.

b) *Réactifs*

Terre à foulon : *Floridin Earth X S* (*British Drug Houses Ltd*)
— Acide chlorhydrique $d = 1{,}18$;
— Chlorure stanneux ;
— Alcool éthylique absolu exempt d'aldéhydes (redistiller 1 litre d'alcool absolu sur 1 gramme de permanganate de potassium et 2 g d'hydroxyde de sodium). Conserver à l'abri de la lumière ;
— Benzène ;
— Chlorure ferrique hydraté, solution à 0,2 p. 100 dans l'éthanol absolu. Conserver à l'abri de la lumière.
— $\alpha\alpha'$ dipyridyle, solution éthalonique à 0,07 p. 100.

Mode opératoire

Toutes les opérations doivent être menées en lumière artificielle peu intense.

Préparation de la colonne :

2 g de *Floridin Earth X S* et 0,3 g de chlorure stanneux sont additionnés de 12 ml d'acide chlorhydrique et portés à ébullition trois minutes. Après refroidissement, le mélange est versé en une seule fois dans la colonne à chromatographie. La terre est tassée lors de l'écoulement de la solution acide par une légère surpression de gaz carbonique, puis elle est lavée par 5 fois 5 ml d'éthanol, puis par 5 fois 5 ml de benzène.

Une solution benzénique d'huile à environ 400 mg/ml permet par pipettage d'introduire la prise d'essai (dont nous verrons plus loin l'importance désirable). On élue par du benzène et on recueille 50 ml d'éluat, ce qui doit durer au moins une heure et demie.

Détermination colorimétrique :

Dans une fiole jaugée de 10 ml, on pipette 5 ml d'éluat, 3,5 ml de solution d'$\alpha\alpha'$-dipyridyle, 0,5 ml de solution de chlorure ferrique, et on complète par de l'éthanol. Deux minutes après l'addition du chlorure ferrique on mesure l'absorption spectrophotométrique à 520 mμ par rapport à une cuve contenant de l'alcool, soit E_1.

De la même façon, on pipette 5 ml de benzène et la même quantité de réactif pour obtenir E_0, valeur du témoin (qui doit être inférieure à 0,060 sinon la solution de chlorure ferrique doit être changée).

$E = E_1 - E_0 + e$

e étant la valeur de l'atténuation due à la présence de glycérides et dont le mode de calcul sera vu plus loin.

E permet de calculer la teneur en tocophérols totaux exprimée en α-tocophérol compte tenu du coefficient :

$E \frac{1\ g/l}{1\ cm} = 39{,}2$, ce qui équivaut à $E \frac{10\ mmg/ml}{1\ cm} = 0{,}392$ dans la cuve de mesure.

L'obtention d'un éluat coloré peut être due à la présence d'eau dans l'éthanol, à une élution trop rapide, à une trop forte prise d'essai.

2) Mesure de l'atténuation de la densité optique du complexe ions ferreux — $\alpha\alpha'$-dipyridyle par les glycérides

L'huile est filtrée par deux fois en solution benzénique sur charbon actif pour obtenir une solution de glycérides à 80 mg/ml. D'autre part, on utilise une solution benzénique d'*α-dl*-tocophérol (Hoffmann-La Roche et Cie) à environ 60 mmg/ml.

On peut alors préparer des solutions ayant des teneurs variables en glycérides et en tocophérols.

Pour des densités optiques inférieures à 0,600, et pour des teneurs en glycérides inférieures à 30 mg/ml dans la cuve de mesures, il y a double proportionnalité entre l'atténuation et la teneur en glycérides d'une part, et la densité optique d'autre part.

Pour une densité optique de 0,300, l'atténuation est de 0,001 pour 1 mg de glycérides par ml. Cette mesure est faite une fois pour toutes.

— Exemple de calcul : Si, comme il a été vu, on opère le dosage sur 5 ml de 50 ml d'éluat, la teneur en glycérides de la cuve de mesure par ml est sensiblement égale au centième de la prise d'essai, compte tenu du fait que ces 5 ml ont été portés à 10 par addition des réactifs. Il suffit de calculer l'atténuation due à 1 mg de glycérides par ml et de multiplier ce chiffre par le centième de la prise d'essai.

Ainsi, pour une prise d'essai de 1 500 mg et une densité optique mesurée de l'ordre de 0,400, l'atténuation sera :

$$0{,}0013 \times 15 = 0{,}0195 \text{ soit approximativement } 0{,}020$$

En négligeant cette atténuation, l'erreur par défaut aurait été de 20/400 = 5 p. 100.

3) Justification de la méthode

Par chromatographie d'une solution d'huile sur terre à foulon on adsorbe sur la colonne les peroxydes, les phospholipides, les xanthophylles et les carotènes. Ces derniers sont élués lorsque cette opération est mal conduite. N'ayant jamais obtenu d'éluats colorés, il nous importait surtout de connaître la prise d'essai maximum permettant d'éluer tous les tocophérols dans les 50 premiers ml.

En outre, les densités optiques étant faibles, il était évidemment possible de concentrer l'éluat sous vide. En fait, nous avons cherché à éviter cette opération supplémentaire en réduisant la quantité de terre à foulon. La très faible teneur en carotène de l'huile nous y autorisait à priori.

C'est pourquoi, nous avons comparé le comportement de trois types de colonnes contenant respectivement 5 g, 2 g et 1 g de terre adsorbante (*Floridin Earth X S Britisch Drug Houses Ltd*).

Dans chaque cas nous avons utilisé une huile de pépins de *Carignan*. Dans les essais à 5 g, il s'agissait d'une huile de pépins non fermentés. Dans les autres, à défaut de cette huile, dont il ne restait qu'une quantité insuffisante, on a utilisé une huile de pépins de même origine (lieu et cépage), mais provenant de marc fermenté. Des essais antérieurs nous ont montré que cette substitution était valable dans le cas des essais en cours.

Avec 5 g la préparation de la colonne est celle indiquée par le Comité des Méthodes Analytiques telle qu'elle est rapportée par Paquot C. et *al.*

Avec 1 g de terre adsorbante, même bien tassée par surpression de CO_2, le débit de la colonne est trop rapide. On a dû utiliser un tube d'Allihn à verre fritté de porosité 4.

Nous avons finalement préféré opérer sur 2 g de terre, comme il a été indiqué plus haut et les résultats indiqués plus loin justifient bien ce choix.

Dans tous les cas l'éluat a été fractionné de 5 en 5 ml ; la première fraction était recueillie dès l'introduction de l'huile, en solution benzénique.

La densité optique ($E_1 - E_0$) de chaque éluat a été déterminée (E_1 densité optique de l'essai — E_0 densité optique de l'essai à blanc).

Les résultats numériques sont inscrits dans le tableau 1.

On voit qu'avec 5 g de terre absorbante il est nécessaire de recueillir 45 ml d'éluat lorsque l'huile contient l'isomère δ. Ceci est d'ailleurs indiqué par les Membres du Comité des Méthodes Analytiques qui opéraient sur insaponifiable.

Il est surtout intéressant de noter que des prises d'essai supérieures au gramme peuvent mener à des élutions incomplètes.

TABLEAU I

Densités optiques obtenues par fractionnement de l'éluat de 5 en 5 ml

N°	Terre	Durée	Quantité d'huile/volume	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5 g	1 h. 30	670 mg/2 ml	0	0,037	0,682	0,492	0,097	0,012	0,004	0,002	0,0	0
2	5 g	1 h. 30	1 000 mg/5 ml	0	0,048	1,010	0,870	0,280	0,160	0,030	0,005	0,001	0
3	5 g	1 h. 30	1 200 mg/5 ml	0	0,056	1,200	0,910	0,300	0,080	0,046	0,028	0,023	0,019
4	1 g	1 h. 30	800 mg/2 ml	1,0	0,210	0,007	0,002						
5	2 g	1 h. 40	2 000 mg/5 ml	0,150	2,000	1,100	0,162	0,060	0,034	0,031	0,020	0,018	0,014
6	2 g	1 h. 45	1 500 mg/5 ml	0,130	1,800	0,800	0,090	0,018	0,014	0,008	0,008	0,005	0,00

Avec 1 g (4e ligne du tableau) de terre absorbante tous les tocophérols peuvent être élués dans les 25 premiers ml pour une prise d'essai d'huile relativement importante. L'inconvénient est qu'alors le lavage de la terre est très lent et est souvent imparfait.

Avec 2 g on voit (5e et 6e ligne du tableau) que des élutions totales en 50 ml peuvent être obtenues pour des prises d'essai allant jusqu'à 1 500 mg, soit pour 1 mg de tocophérols totaux.

Il était important de s'assurer de la relation entre la densité optique et la grandeur de la prise d'essai.

La densité optique a été appréciée sur 5 cc d'éluat de 50 ml recueillis en totalité dans une fiole jaugée de 50 ml. On a opéré sur des prises d'essai d'huile allant de 0 à 1 200 mg chromatographiès sur 5 g de terre à foulon.

Les résultats correspondants nous ont permis d'établir la courbe I de la figure 1.

En opérant avec l'huile n° 2 et 2 g de terre on a obtenu la courbe II de la figure 1.

On voit qu'il s'agit pratiquement de droites.

Enfin une série de 6 essais avec 1 000 mg d'huile et avec 5 g de terre à foulon, a fourni des densités optiques corrigées ne différant que de 0,004 au plus de la valeur indiquée par la droite I, soit une erreur relative de 2 p. 100.

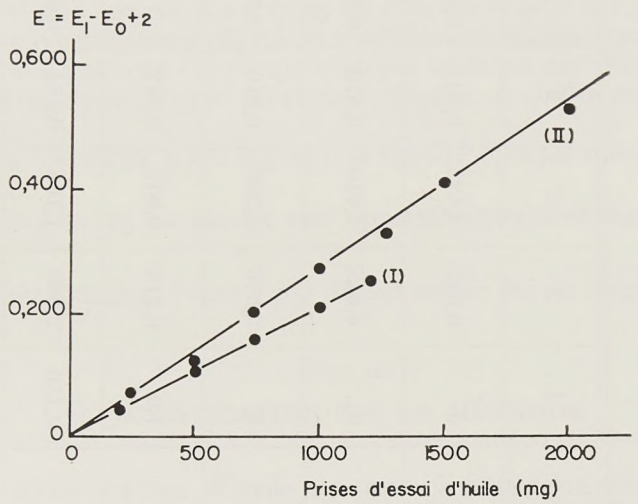


FIG. 1. — *Relation entre la densité optique corrigée obtenue et la dimension de la prise d'essai*

I. — RÉSULTATS

Les résultats obtenus par cette méthode sur des huiles de pépins de raisin, dont nous verrons en premier lieu le mode d'obtention ont été comparés à ceux obtenus par la méthode adoptée par SILVESTRE.

a) *Obtention de l'huile de pépins de raisin*

Les pépins proviennent du Domaine Expérimental de Pech-Rouge (Gruissan, Aude), et ont été obtenus sur des marcs frais, fermentés ou non, dès la sortie du pressoir. En ajoutant de l'eau au marc, on peut facilement éliminer les rafles, puis les pellicules dont la densité est plus faible que celle des pépins. D'autre part, on élimine ainsi les pépins sans albumen. Enfin, on sépare les pépins des impuretés mouillables en les amenant doucement en surface où leur couche externe cireuse leur permet de se maintenir un temps suffisant pour qu'il soit facile de les recueillir. Ces pépins sont alors séchés à l'air libre ou plus rapidement aux infra-rouges, jusqu'à une teneur en eau d'environ 10 p. 100.

Les pépins secs sont broyés une première fois et subissent une première extraction de 2 à 3 heures, puis rebroyés et soumis à une deuxième extraction de 4 heures avec dans les deux cas de l'éther de pétrole 35-63. Le solvant est évaporé sous réfrigérant descendant en vue d'en récupérer la majeure partie, puis sous vide dans un léger courant de gaz carbonique et au bain-marie bouillant.

L'huile est ensuite stockée au frigidaire à — 5°C, après barbotage de gaz carbonique. Lors de son utilisation, elle est filtrée en vue d'éliminer un dépôt de farinettes et de mucilages.

Dans ces conditions, nous avons préparé des huiles des cépages de *Vitis vinifera*, 1 huile de *Morastel*, 2 huiles de *Carignan*.

b) *Méthode de Meunier et Vinet*

Ne possédant pas le photocolorimètre de MEUNIER, nous avons essayé d'adapter la méthode au ferricyanure ferrique au spectrophotomètre de JOBIN et YVON (modèle Algérie).

Deux cuves en verre de 3 cm de largeur et de 1 cm d'épaisseur contenant chacune 5 ml de réactif sont placées dans l'appareil réglé à la longueur d'onde de 660 mμ. Dans la première on introduit 0,5 ml de chloroforme, dans la seconde 0,5 ml de la solution à étudier. En s'aidant d'une solution chloroformique de α - *dl* - tocophérol, on établit une courbe étalon. On opère de la même façon pour des solutions chloroformiques d'huile. Dans tous les cas la mesure est faite 15 à 20 secondes après l'addition des produits réducteurs.

Ainsi ont été obtenus les chiffres indiqués dans la troisième colonne du tableau 2.

TABLEAU 4

Composition de quelques huiles de pépins en tocophérols (Comparaison des techniques)

	5 g (°/oo)	2 g (°/oo)	Silvestre (°/oo)
Huile de *Morastel*	0,723	0,718	0,9
Huile de *Carignan* (I)	0,527	0,531	0,7
Huile de *Carignan* (II)	0,680	0,690	0,8
Huile commerciale	0,473	0,485	0,6

c) *Comparaison des résultats*

Ayant constaté que sur des huiles enrichies ou non en tocophérols, nous n'obtenions que moins de 90 p. 100 des tocophérols par chromatographie des insaponifiables, nous avons abandonné cette technique.

Le tableau 2 indique les résultats obtenus sur quatre huiles de pépins de raisin par chromatographie directe de l'huile sur 5 et 2 g de *Floridin Earth X S*, suivi d'un dosage par le réactif d'EMMERIE-ENGEL. Les chiffres de la troisième colonne corres-

pondent aux résultats obtenus en opérant directement sur une solution d'huile sans saponification ni chromatographie préalable, comme le faisait SILVESTRE (1953).

Les résultats des deux premières colonnes sont très voisins, ceux de la troisième sont entachés d'une erreur par excès due à la présence dans l'huile de phospholipides qui réduisent le ferricyanure ferrique aussi rapidement que les tocophérols.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous voudrions attirer ici l'attention sur deux points particuliers : le rôle des peroxydes d'une part, d'autre part, celui d'antioxygènes utilisés industriellement comme conserveurs.

1) *Élimination des peroxydes*

Les peroxydes sont adsorbés sur terre à foulon, et des dosages effectués sur des huiles placées à l'étuve à 65°C, nous ont montré qu'un gramme de *Floridin Earth X S* pouvait adsorber tous les peroxydes de 0,5 g d'huile d'indice de peroxydes égal à 50 (méthode à chaud G. et J. P. WOLFF, 1953), soit 0,05 méq de péroxydes exprimés en oxygène actif.

2) *Antioxygènes utilisés comme conserveurs en huilerie*

L'huile de pépins de raisin du commerce citée plus haut (tableau 2), a une teneur anormale en « tocophérols ». C'est en effet une huile raffinée, et on sait quelle est la perte en tocophérols lors notamment de l'élimination des lécithines (démucilagination). Par extraction à l'eau de cette huile en solution dans un solvant apolaire, c'est la phase aqueuse qui réagit le plus vivement sur le chlorure ferrique. Cet antioxygène n'est ni de l'acide ascorbique (pas de précipité à la 2-4 dinitrophénylhydrazine), ni un gallate (pas d'absorption à 274 mμ J. P. WOLFF, 1957).

Le dosage des tocophérols est alors mené sur une solution benzénique extraite à l'eau, évaporée sous vide au bain-marie pour éliminer les dernières traces d'eau (ne pas sécher sur sulfate anhydre de sodium qui contient des traces de fer ferrique) ; l'huile est remise en solution benzénique et une certaine fraction de celle-ci est utilisée pour la suite du dosage qui s'effectue comme il a été vu.

Dans le cas de l'huile commerciale en question, nous avons alors trouvé une teneur de 0,260 p. 1 000.

Nous conclurons en disant que la composition relativement simple de l'huile de pépins de raisin, ainsi que sa teneur élevée en tocophérols, nous a permis de nous assurer d'une méthode *rapide et précise* de dosage ; elle est directement inspirée des observations de MEUNIER et VINET.

Il est très probable qu'elle puisse être utilisée pour le dosage des tocophérols totaux dans de nombreuses autres huiles végétales.

Nous envisageons d'étudier les erreurs qui peuvent être dues à l'addition de produits antioxygènes.

Reçu pour publication en octobre 1963.

SUMMARY

A STUDY OF THE DETERMINATION OF TOTAL TOCOPHEROLS. APPLICATION TO GRAPE SEED OIL

Tocopherols' determination in grape seed oil can be carried out as follows :

1 — adsorption chromatography of oil in solution in benzene on Floridin Earth X S ;

2 — spectrophotometric determination by EMMERIE-ENGEL reagent, and correction of the decreasing effect of fats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANALYTICAL METHODS COMMITEE., 1959. The determination of tocopherols in oils, foods and feedingstuffs. *Analyst.*, **84**, 354-372.

EMMERIE A., ENGEL C., 1938. Colorimetric determination of tocopherols (Vitamin E). *Rev. Trav. Chim. Pays Bas.*, **57**, 1351-1355.

FLANZY J., FLANZY M., 1959. Note sur la valeur de l'huile de pépins de raisin en acides gras essentiels. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 107-111.

KAUNITZ H., BEAVER J., 1944. The determination of tocopherols with iron-dipyridine reagent in presence of fats. *J. Biol. Chem.*, **156**, 563-659.

MEUNIER P., VINET A., 1941. Dosage colorimétrique du tocophérol (vitamine E) au ferricyanure ferrique. Premières applications. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, 217-222.

MEUNIER P., VINET A., 1948. Chromatographie des extraits lipoïdiques totaux des tissus en vue de la détermination de leur teneur en vitamine E (tocophérol). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 365-370.

PAQUOT C. et *al.*, 1962. Les méthodes analytiques des lipides simples. *Cah. techn. C. N. R. S.*, **8**, 175-181 ; et *Ann. Nutr. et Alim.*, **16**, I, 1 et 2, 175-181.

PRÉVOT A., CABEZA F., 1962. Note sur la composition de quelques corps gras peu communs par chromatographie en phase gazeuse. *Rev. Fr. Corps gras*, 9, **3**, 149-152.

SILVESTRE J., 1953. *Thèse Faculté de Pharmacie, Toulouse.*

WOLFF J. P., 1957. Application de la spectrophotométrie UV à l'examen de la qualité des corps gras alimentaires. *Ann. Fals. et Fraudes.*, **580**, 149-162.

WOLFF G., WOLFF J. P., 1953. *Méthodes d'analyse et de contrôle industriel des matières grasses.* Éd. Dunod, Paris.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (1), 77-80

LA PHOTOLYSE DE LA RIBOFLAVINE DU LAIT. INFLUENCE DE QUELQUES TRAITEMENTS INDUSTRIELS

M. LHUISSIER et Evelyne BIETTE

Laboratoire d'Étude des Qualités biologiques des Aliments de l'Homme, Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

La photolyse de la riboflavine a été étudiée dans divers types de laits :

I lait cru,
II lait pasteurisé,
III lait pasteurisé, préstérilisé (procédé U. H. T.),
IV lait pasteurisé, préstérilisé, homogénéisé,
V lait pasteurisé, préstérilisé, homogénéisé, stérilisé en bouteilles.

Après exposition de ces produits à une source de lumière artificielle, la perte de riboflavine a été identique dans tous les cas, sauf dans celui du lait stérilisé en bouteilles où elle a été inférieure. L'effet protecteur exercé par la stérilisation ne peut être expliqué actuellement.

INTRODUCTION

Le lait est une source importante de riboflavine si celui-ci a été protégé de la lumière. Le lait est encore souvent conditionné en bouteilles de verre blanc, et, par suite de précautions insuffisantes, sa teneur en riboflavine peut être abaissée (Causeret et *al.*, 1961). La riboflavine peut être protégée quand le lait est conditionné en bouteilles de verre ambré (Hugot, Lhuissier, Causeret, 1962), ou en emballage opaque — carton imprimé en noir sur sa face interne — (Lhuissier, Hugot, Biette, 1962). Ces divers types de conditionnement étudiés, il importait de savoir si certains traitements subis par le lait ont une influence sur la vitesse de photolyse de la riboflavine.

Stamberg et Theophilus (1945) ont étudié le comportement des laits cru, pasteurisé, ou homogénéisé exposés en bouteilles de verre blanc de « un quart », à la lumière solaire directe, à une température de + 16 à + 19°C.

Les pourcentages de perte de riboflavine observés par ces auteurs ont été les suivants :

	Durée d'exposition	
	1 heure	2 heures
	—	—
Lait cru	20	40
Lait pasteurisé	20	35
Lait homogénéisé	13	28

Ziegler (1944) n'a pas mentionné de différence entre les comportements des laits cru, cru homogénéisé, pasteurisé, ou pasteurisé homogénéisé en bouteilles de verre blanc de « un quart ».

Il importait donc de reprendre cette étude de manière systématique en cherchant, non seulement à mettre en évidence d'éventuels effets de la pasteurisation et de l'homogénéisation sur la photolyse de la riboflavine, mais aussi de la préstérilisation et de la stérilisation en bouteilles.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les échantillons de lait énumérés sur la figure 1, ont été prélevés le long de la chaîne de traitement d'une usine laitière (à l'exception du lait cru qui a été comparé de façon séparée au lait pasteurisé).

Les traitements appliqués au lait ont été les suivants :

a) *Pasteurisation :*

— Échantillons des expériences n° 1 à 3 : pasteurisation basse : 63-65°C pendant 30 minutes ;
— Échantillons des autres expériences : pasteurisation haute : 82°C appareil à plaques (1).

b) *Préstérilisation :*

— dans un appareil à ultra-haute-température, 141°C pendant 5 secondes environ (2) ;
— température du lait à la sortie de l'embouteilleuse : + 69°C.

c) *Homogénéisation :*

— à une pression de 200 kg (3).

d) *Stérilisation en bouteilles* :

— entrée dans le stérilisateur (4) : 66°C ; — sortie du stérilisateur 55-60°C.
— durée totale du passage dans le stérilisateur : 51-52 minutes ;
— température maximum et durée de stérilisation : 118,5°C pendant 15 minutes.

Chacun des échantillons a été soumis à un éclairement de 3 à 9 minutes par lampe à incandescence (environ 100 000 lux au niveau de la surface du lait) ; le lait étant disposé en couche de 2 cm d'épaisseur à 24 cm de la lampe.

Le lait était contenu dans un bécher plongé dans un bain thermostaté. Il a été nécessaire d'installer un dispositif destiné à éviter que la température du lait ne s'élève trop fortement : ce dispositif comprenait un soufflage continu d'air comprimé entre la lampe et la surface du lait et un système d'agitation de ce dernier. Dans ces conditions, la température du lait s'est maintenue à + 50°C pendant toute la durée de l'irradiation, et la formation d'une « peau » superficielle a été évitée.

La riboflavine a été dosée par voie microbiologique (Snell, Strong, 1939).

(1) Alfa Laval.
(2) Laguilharre, Courbevoie (Seine).
(3) Rammie.
(4) Breil, licence Webster, Paris.

RÉSULTATS

L'étude des résultats reportés sur la figure 1 montre que les traitements étudiés n'ont pas exercé d'influence sensible sur la photolyse de la riboflavine, à l'exception de la stérilisation en bouteilles : dans tous les échantillons de lait stérilisé en bouteilles, la résistance de la vitamine à l'action destructrice de la lumière s'est avérée accrue.

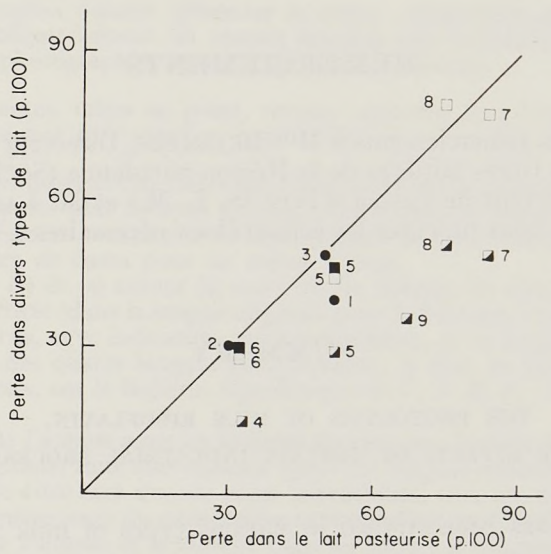


FIG. 1. — *Pourcentages de perte observés dans les laits* :

- ● cru
- ■ pasteurisé, préstérilisé
- □ pasteurisé, préstérilisé (échantillons 4 et 5), homogénéisé,
- ◪ pasteurisé, préstérilisé (échantillons 4 et 5), homogénéisé, stérilisé en bouteilles,

en fonction du pourcentage de perte dans le lait pasteurisé.

Les échantillons portant le même numéro ont même origine et ont été irradiés au cours d'une même expérience.

DISCUSSION

Nos résultats, contrairement à ceux de STAMBERG et THEOPHILUS (1945), semblent signifier que l'homogénéisation n'exerce aucun effet sur la résistance de la riboflavine à l'action destructrice de la lumière.

Il faut toutefois remarquer que la teneur du lait en matière grasse peut avoir une forte influence en ce qui concerne l'effet de l'homogénéisation sur la transparence du lait aux rayons lumineux, et par contre-coup la vitesse de la photolyse de la riboflavine. Le bris des particules protéiques et surtout des globules gras s'accompagne d'une augmentation de la densité optique du lait (ASHWORTH, 1951).

Mais les mesures effectuées avec une lumière incidente de longueur d'onde voisine de 500 mμ correspondant à la destruction maximale de la riboflavine (Jo-

SEPHSON, 1946) (0,7 pour le lait pasteurisé, 1,1 pour le lait préstérilisé et pour le lait préstérilisé et homogénéisé, 1,2 pour le lait stérilisé en bouteilles) n'ont pas permis d'établir une relation entre les valeurs de densité optique et la rapidité de la photolyse.

L'effet protecteur entraîné par la stérilisation en bouteilles elle-même ne peut être expliqué actuellement. On peut se demander si, du fait du traitement thermique relativement sévère qu'implique la stérilisation en bouteilles, la riboflavine passe sous une forme moins sensible à l'action de la lumière, ou bien s'il y a disparition de facteurs qui favorisent la photolyse de la riboflavine ou encore apparition de facteurs protecteurs.

Reçu pour publication en décembre 1963.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos vifs remerciements à Mlle BEJAMBES, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., à M. VENET, Directeur des Gares laitières de la Région parisienne (Société Laitière Métropolitaine) ainsi qu'à M. DULEX, Directeur de l'usine d'Ivry (S. L. M.) et M. LAROQUE, chimiste (S. L. M.), grâce à qui nous avons pu nous procurer les échantillons nécessaires à cette étude.

SUMMARY

THE PHOTOLYSIS OF MILK RIBOFLAVIN.
THE EFFECTS OF CERTAIN INDUSTRIAL PROCESSES

Riboflavin photolysis has been studied in various types of milk :

I raw,
II pasteurized,
III pasteurized, presterilized (UHT),
IV pasteurized, presterilized, homogenized,
V pasteurized, presterilized, homogenized, sterilized in-bottle.

The loss of riboflavin in these products after exposure to artificial light was the same in all cases except for milk sterilized in bottle, where it was lower. The reason for the protective effetc exercised by this sterilization was not understood.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASHWORTH U. S., 1951. Turbidity as a means for determining the efficiency of homogenization. *J. Dairy Sci.*, **34** (4), 317-320.

CAUSERET J., HUGOT D., GOULAS-SCHOLLER C., MOCQUOT G., 1961. Évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 289-300.

HUGOT D., LHUISSIER M., CAUSERET J., 1962. Effet protecteur des bouteilles de verre ambré contre les pertes de riboflavine et de vitamine A dues à l'exposition du lait stérilisé à la lumière. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 145-151.

JOSEPHSON D. V., 1946. Some observations regarding the effect of various wavelenghts of light on the riboflavin content and flavor of milk. *J. Dairy Sci.*, **29**, 508-510.

LHUISSIER M., HUGOT D., BIETTE E., 1962. Étude vitaminologique du lait « upérisé » conditionné aseptiquement en récipients Tetra Pak : influence de la conservation. *L'Industrie Laitière*, **194**, 319-320.

SNELL E. E., STRONG F. M., 1939. A microbiological assay for riboflavin. *Industr. Engng. Chem. Anal. Ed.*, **11**, 346.

STAMBERG O. E., THEOPHILUS D. R., 1945. Photolysis of riboflavin in milk. *J. Dairy Sci.*, **28**, 269.

ZIEGLER J. A., 1944. Photochemical destruction of vitamine B_2 in milk. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1 039.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de ... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction,* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour la collaboration, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.
Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses, de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la World-List of Scientiffc Periodicals, sur le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.
Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sauf abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in » le titre de l'ouvrage.
La mention « communications personnelles » ou « données non publiées », etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.
Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.
Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une feuille séparée, et porter les numéros des figures.
Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5 *soit,* × 0,25.
Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.
Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.
Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy en Josas. (Seine et Oise). Envoyer deux exemplaires.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 13 1964 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (2), 85-96.

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES LEVAINS UTILISÉS DANS LA FABRICATION DU GRUYÈRE

J-P. ACCOLAS et J. AUCLAIR

Station centrale de Recherches laitières, et de Technologie des produits animaux
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

57 souches de lactobacilles et 42 souches de streptocoques ont été isolées de deux échantillons de « présure naturelle » prélevés à six mois d'intervalle dans une même fromagerie du Jura.

Parmi les lactobacilles, 56 souches s'apparentent à l'espèce *Lactobacillus lactis* et une souche à l'espèce *L. fermenti*. Dans la population de *L. lactis*, 11 biotypes ont été distingués à l'aide de divers caractères.

Parmi les streptocoques, 40 souches forment une population homogène se rattachant à l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Les deux autres souches appartiennent au groupe de *Str. faecalis*.

Les avantages et les inconvénients résultant de l'emploi des présures naturelles sont discutés.

INTRODUCTION

Dans les fromageries artisanales du Jura et des Alpes (1), où se fabriquent le Gruyère et l'Emmental, les fromagers utilisent encore le plus souvent une technique traditionnelle et empirique : la préparation des « présures naturelles » ou « présures aux caillettes ». Ces termes de métier désignent des macérations dans du lactosérum ou de la « recuite » (lactosérum désalbuminé par chauffage et acidification) de caillettes de veau, préalablement séchées à l'air. Ajoutées au lait lors de l'emprésurage, ces préparations apportent à la fois l'enzyme responsable de la coagulation et la flore lactique qui s'est développée durant la macération. Elles contiennent d'autre part des enzymes et facteurs de croissance variés et constituent un milieu très favorable à la multiplication des bactéries.

(1) Dont le nombre dépasse un millier, et qui fabriquent environ 80 000 tonnes de Gruyère et d'Emmental par an.

Les bactéries lactiques des présures ont un rôle déterminant au cours de la fabrication : en provoquant la fermentation du lactose, elles favorisent la synérèse du caillé. Leur action sur l'égouttage est particulièrement importante durant le séjour du fromage sous presse. Par ailleurs, pendant l'affinage, leur disparition s'accompagne de la libération d'endoenzymes protéolytiques qui interviennent activement dans les processus de maturation.

La bactériologie des présures naturelles a déjà fait l'objet de nombreuses études. Dès 1875, le bactériologiste allemand COHN affirmait que les bactéries présentes dans les présures naturelles intervenaient dans l'affinage des fromages à pâte cuite (DORNER, 1934). A la fin du XIX e siècle, malgré la confusion qui régnait souvent dans la bactériologie laitière débutante (de FREUDENREICH, 1901-1902), les travaux les mieux fondés avaient déjà établi l'importance des « bâtonnets acidolactiques » des présures naturelles. Les premières descriptions de ces bactéries datent de cette époque, en particulier celle de *Bacillus casei* ε isolé par de FREUDENREICH et THÖNI (1904-1905). Parallèlement, ORLA-JENSEN (1919) entreprenait une étude systématique des bactéries lactiques et publiait une monographie qui est demeurée classique. Distinguant un plus grand nombre d'espèces qu'auparavant et proposant une nouvelle classification, ORLA-JENSEN attribuait encore un rôle prépondérant dans la maturation des fromages à *Thermobacterium helveticum* (*Bacillus casei* ε de FREUDENREICH).

Se fondant sur leurs travaux et leurs observations ces bactériologistes envisagèrent très vite de substituer aux présures naturelles l'emploi combiné de présure commerciale liquide ou en poudre et de cultures convenables de bactéries lactiques. De FREUDENREICH et ORLA-JENSEN (1897) admettaient déjà cette possilibité et la confirmaient en grande partie par l'expérimentation. Si ORLA-JENSEN (1907) considérait cette méthode nouvelle comme la plus rationnelle, THÖNI (1906) la jugeait de mise en pratique délicate. Aussi renoncèrent-ils à la vulgariser, se contentant de recommander aux fromagers l'ensemencement de leurs macérations de caillettes avec les bactéries jugées utiles. L'étude de ce problème fut reprise sous un aspect purement technologique par GUITTONNEAU, KEILLING et BARRET (1926). Ces auteurs obtinrent des résultats satisfaisants en utilisant de la présure commerciale liquide et des levains lactiques sélectionnés.

D'importantes études, celles de von KARNICKI et DORNER (1934), von BURRI et ELSER (1941) von BURRI et KOLLMANN (1941), MOSIMANN (1944) introduisaient et précisaient les notions modernes relatives à la bactériologie des présures naturelles. De ces travaux, il résultait que les bactéries lactiques rencontrées le plus fréquemment dans les présures naturelles étaient des lactobacilles thermophiles : *Thermobacterium lactis* (syn. *Lactobacillus lactis*), plus rarement *Thermobacterium helveticum* (syn. *Lactobacillus helveticus*) et *Thermobacterium bulgaricum* (syn. *Lactobacillus bulgaricus*), et des streptocoques thermophiles appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Par ailleurs, en raison du mode de préparation de ces présures, cette flore se trouvait presque toujours associée à une flore sous-dominante très variée : streptocoques, lactobacilles hétérofermentaires, bactéries coliformes, bactéries acétiques, levures, germes dont l'intérêt était souvent discutable ou qui apparaissaient même comme franchement nuisibles.

Malgré le progrès des connaissances en bactériologie, malgré des expériences encourageantes, la méthode utilisant présure commerciale et levains s'est toujours heurtée à beaucoup de réserves de la part des fromagers. Les fromages fabriqués à

l'aide de présure naturelle seraient, d'après les connaisseurs, de qualité supérieure et, en particulier, de goût plus fin que les fromages faits à l'aide de levains composés de souches pures de bactéries lactiques. Cette différence proviendrait de la flore beaucoup plus variée existant dans les présures naturelles.

La taxinomie des lactobacilles ayant fait l'objet au cours des dix dernières années de plusieurs études, il nous a paru intéressant d'analyser, à la lumière de ces données nouvelles, la flore bactérienne des présures naturelles en recherchant dans quelle mesure la flore lactique de ces préparations se compose de quelques types bien définis, ou, au contraire, d'une grande variété de types bactériens ayant des caractères plus ou moins différents de ceux des espèces décrites dans la littérature.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Deux échantillons de présure naturelle ont été prélevés à six mois d'intervalle dans une fromagerie du Jura dont la production de Gruyère de Comté était régulièrement très bonne.

Pour préparer la présure naturelle, les fromagers opèrent selon des techniques traditionnelles, mais quelque peu variables d'un artisan à l'autre. A titre d'exemple, nous décrirons la préparation de la présure naturelle telle que nous l'avons vu pratiquer par l'un des meilleurs artisans du Jura, dans la fromagerie où fut effectué notre échantillonnage.

Pour préparer la macération, le fromager utilise un sérum privé d'albumine (en terme de métier la « recuite ») obtenu de la façon suivante : le lactosérum prélevé dans la chaudière à la sortie du fromage est chauffé jusqu'à l'ébullition et acidifié vers pH 5,0 par addition rapide d'une culture lactique (« l'aisy »), afin de provoquer la coagulation des protéines solubles.

L'aisy est préparé par acidification spontanée de la recuite maintenue à la température ambiante de la fromagerie. Afin de maintenir une acidité convenable et de renouveler le milieu, la culture est régulièrement additionnée d'une certaine quantité de recuite chaude.

Après séparation des protéines coagulées et rassemblées en surface (ce qu'on appelle le « séret » ou « sérac »), le liquide clair constituant la recuite est soutiré dans le pot à présure (environ 15 à 20 litres.) Celui-ci est abandonné pendant plusieurs heures à la température ambiante de la fromagerie, jusqu'à ce que la température du liquide soit descendue à 51°C. Le pot reçoit alors la quantité nécessaire de caillettes (1,5 à 2 g par l), puis est mis à l'étuve à 40-42°C. Il est retiré le lendemain matin avant la fabrication du fromage, après 15 à 18 heures d'incubation. Dans ces conditions, l'acidité de la macération varie entre 70 et 90° D. La présure non utilisée le jour même est conservée au réfrigérateur et est employée le jour suivant.

Parfois le fromager procède à un très faible repiquage d'une présure à l'autre (une à deux gouttes pour 20 à 25 litres).

TECHNIQUES

A) *Milieux*

Des dilutions des échantillons de présure étaient préparées dans du bouillon V.P.T., milieu décrit par DICKINSON et MOCQUOT (1961), et comprenant : Extrait de viande Lab Lemco : 0,5 g ; Peptone Evans : 0,5 g ; Tryptone Difco : 1 g ; Eau désionisée : 100 ml ; pH ajusté à 7,5 avant stérilisation.

Pour l'étude de la flore lactique, dénombrements et tests d'identification, nous avons utilisé un milieu dérivé de ceux décrits par RAIBAUD et *al.* (1961). Ce milieu comprenait : Bacto Autolysed Yeast Difco : 1 g ; Peptone Evans : 1,5 g ; Bacto Tryptone Difco : 1 g ; Tween 80 : 0,1 ml ; Eau désionisée : 100 ml ; pH 7,6 à 7,8 avant la 1re stérilisation à 120°C, 20 mn ; Filtration en présence d'Hyflo-supercel (JOHNS-MANVILLE) et répartition en tubes avant la deuxième stérilisation à 118°C, 20 mn.

Pour la commodité du texte, ce milieu de base sera désigné soit comme milieu G (milieu gélosé à 2 g p. 100 ml) soit comme milieu L (milieu liquide).

B) *Étude quantitative*

Le dénombrement des différentes espèces de microorganismes était effectué à partir de dilutions décimales des deux échantillons de présure sur bouillon V.P.T., de la façon suivante :

1°) *Flore dominante (lactobacilles et streptocoques).*

a) *Dénombrement sur milieu gélosé.*

— La recherche des lactobacilles était pratiquée sur le milieu G additionné de glucose (1 g p. 100 ml). Le milieu gélosé décrit par BRIGGS (1953 *a*) fut également utilisé, à titre comparatif, pour le premier échantillon de présure.

Après ensemencement, les milieux gélosés étaient coulés en tubes de 8 × 400 mm, afin de réaliser les conditions d'anaérobiose favorables à la croissance des lactobacilles. Les tubes étaient examinés après 3 jours d'incubation à 37°C.

— La recherche des streptocoques était effectuée sur le milieu G additionné de saccharose (0,1 g p. 100 ml). Les boîtes de Petri étaient incubées pendant 3 jours à 37°C.

La faible concentration en sucre d'une part, l'incubation en boîtes de Petri d'autre part, tout en permettant le développement des streptocoques, nuisent à la croissance des lactobacilles

b) *Dénombrement sur lait tournesolé.*

L'étude de la flore dominante fut complétée par l'ensemencement des dilutions successives sur lait tournesolé. Chaque dilution était ensemencée sur trois tubes de lait tournesolé, à raison d'1 ml par tube. Après 24 et 48 h d'incubation à 37°C le contenu microbien des tubes coagulés, ou présentant un virage du tournesol, était examiné au microscope, après coloration au bleu de méthylène d'un frottis sur lame. Un tel examen, complété par une interprétation quantitative des résultats à l'aide de la table de MCGRADY, permet d'obtenir un dénombrement rapide et assez satisfaisant des différentes bactéries présentes en dominance (lactobacilles ou streptocoques).

2°) *Bactéries coliformes.*

Cette recherche était effectuée sur un milieu gélosé contenant 0,1 g p. 100 de désoxycholate de sodium (Désoxycholate Agar Difco n° 273). Les boîtes de Petri étaient incubées à 30°C et dénombrées après 24 heures d'incubation.

C) *Étude qualitative de la flore dominante (lactobacilles et streptocoques).*

Après dénombrement, une centaine de colonies furent prélevées dans les tubes ou sur les boîtes de Petri et repiquées en milieu liquide. Ces cultures furent purifiées par réisolement sur le milieu G additionné de glucose à raison de 1 g p. 100 ml, incubé en tubes de 8 × 400 mm. Au total 57 souches de lactobacilles et 42 souches de streptocoques furent ainsi isolées à partir des deux échantillons de présure naturelle, et soumises à l'identification. Les caractères suivants furent étudiés :

1°) *Croissance à différentes températures.*

Les températures choisies étaient les suivantes : 15°C, 45°C, 48°C pour les lactobacilles, 10°C et 45°C pour les streptocoques. Les cultures étaient effectuées sur lait tournesolé, dans des bains-marie réglés avec une précision de ± 0,1°C.

2°) *Résistance au sel et au teepol.*

Le milieu L glucosé (1 g p. 100 ml) était additionné de chlorure de sodium (2 g p. 100 ml, 4 g p. 100 ml et 6,5 g p. 100 ml) ou de teepol (0,1 g p. 100 ml).

3°) *Thermorésistance.*

La technique utilisée était celle d'ABD-el-MALEK et GIBSON (1948) : chauffage en lait autoclavé à 63°C pendant 30 mn et ensemencement en milieu G + glucose (1 g p. 100 ml) en tubes de 8 × 400 mm. Sur ce milieu, les souches donnant moins de 20 colonies par tube étaient considérées comme non thermorésistantes.

4°) *Action sur le lait tournesolé.*

L'acidification et la coagulation du lait, la réduction du tournesol étaient observées au cours de l'incubation à 37°C, après 24 h ,48 h et une semaine (pour les souches à faible pouvoir acidifiant).

5°) *Recherche de la catalase.*

Les colonies développées dans le milieu G glucosé (1 g p. 100 ml) étaient prélevées et mises e présence d'une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes déposée sur une lame, afin d'observer la forma tion éventuelle de bulles d'oxygène.

6°) *Production de gaz à partir du glucose.*

Le milieu utilisé était le milieu L additionné de 20 g p. 100 ml de gélatine et de 50 g p. 100 ml de glucose. Après ensemencement, on coule sur ce milieu un peu de gélose nutritive, pour former un bouchon selon la technique préconisée par ABD-el-MALEK et GIBSON (1945). Les lactobacilles et les streptocoques hétérofermentaires produisent du gaz qui soulève le bouchon de gélose.

7°) *Production d'acétoïne* (pour les streptocoques seulement).

Les souches étaient cultivées sur le milieu citrate-lactose décrit par SWARTLING (1951) et la présence d'acétoïne était recherchée selon la technique de VOGES-PROSKAUER modifiée par BARRITT (1936).

8°) *Désamination de l'arginine.*

Les souches étaient cultivées sur le milieu L additionné d'une faible quantité de glucose (0,1 g p. 100 ml) et de L-monochlorhydrate d'arginine (0,3 g p. 100 ml). Après une semaine d'incubation on recherchait la présence d'ammoniaque dans le milieu à l'aide du réactif de NESSLER, la lecture de la réaction étant faite immédiatement après l'addition du réactif.

9°) *Fermentation des glucides et alcools.*

Le milieu de base utilisé était le milieu L additionné de rouge de chlorophénol (0,004 g p. 100 ml). Le maltose, le sorbose et l'arabinose étaient stérilisés par filtration en solution concentrée (5 g p. 100 ml) et ajoutés à raison d'1 ml par tube contenant 9 ml de milieu. Les autres sucres ou alcools étudiés étaient ajoutés directement au milieu de base, avant la seconde stérilisation. La concentration finale dans le milieu était de 0,5 g p. 100 ml.

L'indicateur de pH permet de suivre la rapidité et l'intensité de l'acidification. L'incubation était poursuivie durant trois semaines, au terme desquelles le pH était déterminé à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre. Le test était considéré comme positif si le pH était inférieur à 5,6.

Le milieu de base était ensemencé avec chaque souche afin de servir de témoin à l'épreuve.

10°) *Acidité titrable* (pour les lactobacilles seulement).

Les souches étaient ensemencées dans des tubes contenant 15 ml de lait autoclavé. Après une semaine d'incubation, l'acidité produite était titrée sur 10 g de culture à l'aide de soude N/9, en présence de phénolphtaléine.

11°) *Configuration de l'acide lactique produit* (pour les lactobacilles seulement).

Nous avons utilisé la méthode d'ORLA-JENSEN (1904). Les souches étudiées étaient cultivées dans du lait carbonaté stérilisé. Après incubation à 37°C pendant une semaine, l'acide lactique était extrait sous forme de lactate de zinc. On détermine le pouvoir rotatoire (à l'aide d'un polarimètre de précision JOBIN et YVON) et la teneur en eau de cristallisation de ce sel.

RÉSULTATS

Les résultats des dénombrements effectués sur les deux échantillons de présure naturelle sont indiqués dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Dénombrements

(Nombre de germes par ml de l'échantillon de présure naturelle)

Dénombrements	Échantillon n°1	Échantillon n°2
Sur milieu au désoxycholate (Bactéries coliformes)	Moins de 10	Moins de 10
Sur milieu de BRIGGS (Lactobacilles)	$2{,}2.10^8$	—
Sur milieu G + glucose (Lactobacilles)	$2{,}1.10^8$	$1{,}8.10^8$
Sur lait tournesolé (Lactobacilles)	$4{,}5.10^8$	$2{,}5.10^8$
Sur lait tournesolé (Streptocoques)	$1{,}5.10^8$	$1{,}5.10^7$
Sur milieu G + saccharose (Streptocoques)	$1{,}8.10^7$	2.10^7

Les tableaux 2 et 3 donnent les caractères d'identification des souches de lactobacilles et de streptocoques.

1°) *Les lactobacilles*

Toutes les souches de bactéries en forme de bâtonnets, à coloration de Gram positive et dépourvues de catalase, ont été considérées comme appartenant au genre *Lactobacillus*.

Les 57 souches étudiées se répartissent en 56 souches homofermentaires et 1 souche hétérofermentaire.

Les 56 souches homofermentaires présentent un certain nombre de caractères communs. Toutes forment des granules métachromatiques, mis en évidence par coloration au bleu de méthylène. Toutes sont thermorésistantes, cultivent à 45 et 48°C, tolèrent 2 g p. 100 de chlorure de sodium et 0,1 g p. 100 de teepol. Toutes fermentent

les 6 sucres suivants : glucose, lactose, dextrine, maltose, tréhalose, saccharose,. Les 21 souches pour lesquelles nous avons déterminé la configuration de l'acide lactique formaient de l'acide lactique actif D (—). Les caractères suivants permettent de distinguer un certain nombre de types :

Une souche, bien qu'homofermentaire, désamine l'arginine. Cette particularité a déjà été observée par différents auteurs (Briggs, 1953 *b* ; Raibaud, *communication personnelle*).

53 souches produisent dans le lait autoclavé une acidité titrable assez élevée, variant entre 1,5 et 2,3 g p. 100 ml. Par contre, 3 souches se différencient des précédentes en ne produisant qu'une faible quantité d'acide lactique, voisine de 0,5 g p. 100 ml.

Enfin le cellobiose, la salicine et le mannitol ne sont fermentés que par certaines souches. Sur 56 souches étudiées, 19 fermentent le cellobiose, 32 la salicine et 39 le mannitol.

Parmi les différents caractères étudiés, la présence constante de granules métachromatiques, la configuration de l'acide lactique produit, la thermorésistance, la tolérance au sel, le nombre de sucres fermentés rattacheraient ces souches à l'espèce *L. lactis*, si l'on se réfère aux classifications proposées par De Man (1956) et plus récemment par Sharpe (1962).

La souche hétérofermentaire par ses caractères physiologiques s'apparenterait à l'espèce *L. fermenti* (Sharpe, 1962).

2°) *Les streptocoques*

Nous avons classé dans ce groupe les souches présentant les caractères suivants : formes en diplocoques et streptocoques, coloration de Gram positive, absence de catalase.

Les 42 souches étudiées se répartissent de la façon suivante :

40 souches s'apparentent à l'espèce *Str. thermophilus* par un certain nombre de caractères : la thermorésistance, la croissance à 45°C, la réduction faible et lente du lait tournesolé, le petit nombre de sucres fermentés. Deux caractères les différencient de l'espèce type *Str. thermophilus* telle qu'Abd-el-Malek et Gibson (1948) l'ont décrite : d'une part une croissance légère en présence de chlorure de sodium (2 g p. 100 ml), d'autre part une fermentation plus ou moins intense du maltose. Ces deux caractères ont d'ailleurs été décrits comme positifs chez certaines souches par différents auteurs (Orla-Jensen, 1919 ; von Burri et Elser, 1941 ; Abd-el-Malek et Gibson, 1948).

Deux souches se rattachent par l'ensemble de leurs caractères au groupe de *Str. faecalis :* thermorésistance, croissance à 10°C et 45°C, désamination de l'arginine, tolérance au chlorure de sodium (6,5 g p. 100 ml), fermentation de nombreux sucres.

Chez aucune des 42 souches il n'a été possible de mettre en évidence de production d'acétoïne. On a vérifié que des souches types de *Str. faecalis* et de *Str. diacetilactis* placées dans les mêmes conditions donnaient des réactions très nettement positives, il est donc bien probable que les souches étudiées ne produisent pas d'acétoïne ou en produisent trop peu pour que la technique utilisée permette de le détecter.

TABLEAU 2

Caractères des lactobacilles isolés d'une présure naturelle

Nombre de souches	Gaz (glucose)	NH_3 (arginine)	Croissance à 15°C	Croissance à 45°C	Croissance à 48°C	Thermo-résistance (63°C, 30 mn)	Acide lactique dans le lait (%)	Action sur le lait tournesolé	Tolérance à ClNa 2 %	Tolérance à ClNa 4 %	Tolérance au teepol 0,1 %	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Cellobiose	Mannitol	Salicine
18	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	—	+	—
12	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	+	+	+
7	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	—	—	+
5	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	—	+	+
5	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	—	+	+
4	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	+	+	+
1	—	—	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	—	+	+
1	—	+	—	+	+	+	1,5 à 2,3	ACR	+	—	+	+	+	—	+	+	+
1	—	—	—	+	+	+	0,5	A	+	—	+	+	+	—	+	+	+
1	—	—	—	+	+	+	0,5	A	+	—	+	+	+	—	—	+	+
1	—	—	—	+	+	+	0,5	A	+	—	+	+	+	—	—	+	+
1	+	+	—	+	—	—	0,5	A	+	—	+	±	—	—	—	—	—

Lait tournesolé : A : acidification, C : coagulation, R : réduction.
Groupe I : glucose, lactose.
Groupe II : dextrine, maltose, saccharose, tréhalose.
Groupe III : arabinose, glycérol, inositol, mélézitose, mélibiose, raffinose, rhamnose, sorbose.

TABLEAU 3

Caractères des streptocoques isolés d'une présure naturelle

Nombre de souches	Gaz (glucose)	NH_3 (arginine)	Croissance à		Thermo-résistance (63°C, 30 mn)	Action sur le lait tournesolé	Tolérance à ClNa			Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
			10°C	45°C			2 %	4 %	6,5 %				
40	—	—	—	+	+	A C r	±	—	—	+	—	—	—
1	—	+	+	+	+	A C R	+	+	+	+	+	—	—
1	—	+	+	+	+	A C R	+	+	+	+	+	+	—

Lait tournesolé : A : acidification, C : coagulation, R : réduction, r : réduction faible et lente.
Groupe I : Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose.
Groupe II : Mannitol, Salicine, Tréhalose.
Groupe III : Amidon, Sorbitol.
Groupe IV : Arabinose, Raffinose, Sorbose.

DISCUSSION

Une enquête récente a permis de constater que, dans le département du Jura, près de 100 p. 100 des fromagers utilisent encore des présures naturelles. Parmi eux, 35 p. 100 préparent des présures à la recuite selon des techniques comparables à celle que nous avons décrite, les autres préparent des présures sur lactosérum. Environ 20 p. 100 des fromagers ensemencent régulièrement leurs présures avec des cultures sélectionnées du commerce, les autres n'utilisant ces cultures qu'occasionnellement, en cas de déficience de leurs préparations.

Ces chiffres montrent l'attachement des fromagers à une méthode qui est certainement bien adaptée à la structure artisanale des fromageries de cette région. Malgré des inconvénients certains (activité irrégulière des présures, contaminations fréquentes), cette méthode assure, dans l'ensemble, des fabrications de qualité très satisfaisante.

Du point de vue bactériologique, on peut se demander si la flore bactérienne complexe des présures naturelles présente un avantage sur les levains constitués par des cultures sélectionnées. Nous avons vu que, dans la présure d'une même fromagerie, on pouvait trouver en flore dominante quatre espèces bactériennes différentes *L. lactis*, *L. fermenti*, *Str. thermophilus* et *Str. faecalis*. Les souches identifiées à *Str. thermophilus* semblent former une population homogène. Au contraire, la population de *L. lactis* apparaît composée de plusieurs biotypes nettement distincts. Dans ce dernier cas, la variété des souches présentes dans les présures naturelles constitue peut-être un avantage par rapport à des levains ne comportant qu'une seule souche de lactobacilles. En effet, il n'est pas impossible que les différences observées pour certains caractères biochimiques se retrouvent au niveau d'autres caractères, par exemple, la sensibilité et la spécificité aux bactériophages.

Il est moins sûr que la présence dans la présure naturelle de *L. fermenti*, constitue un avantage. Ce germe, qui provient des caillettes, doit être considéré avant tout comme un germe de contamination. Comme l'a montré RITTER (1959), *L. fermenti* peut être à l'origine de gonflements des fromages ; par contre, il n'a jamais été démontré que ces bactéries jouaient un rôle quelconque dans la qualité du fromage affiné.

Str. faecalis et plus généralement les streptocoques du groupe D présents dans les présures naturelles proviennent également des caillettes. Il est cependant plus difficile de les classer, au même titre que *L. fermenti*, parmi les germes de contamination nuisibles. En effet, ils ne provoquent pas de défauts caractérisés et on peut penser au contraire que ces bactéries jouent un rôle non négligeable dans l'affinage du fromage. Certaines souches de *Str. faecalis* ou de *Str. durans* ont même été utilisées avec succès, comme levains de fromagerie aux États-Unis en raison de leur activité biochimique et de leur tolérance aux variations du milieu : température, pH, concentrations salines (DAHLBERG et KOSIKOWSKI, 1948).

Quel que soit l'intérêt que puisse présenter la présence dans les présures naturelles d'une flore très variée, le rôle fondamental d'un levain de fromagerie est d'assurer une transformation rapide du lactose du lait en acide lactique. Dans les fromages à pâte

cuite, cette acidification est essentiellement le fait de *Str. thermophilus* et des lactobacilles thermophiles homofermentaires tels que *L. lactis* ou *L. helveticus*. Ces bactéries ne proviennent pas des caillettes (MOSIMANN, 1944 ; RAIBAUD, *communication personnelle*), mais résultent soit d'un ensemencement naturel tel que l'a décrit DORNER (1952), soit d'un ensemencement intentionnel par le fromager, par repiquage d'une présure à l'autre.

Le manque d'activité de la flore lactique thermophile des présures naturelles est l'une des causes les plus courantes des difficultés que rencontre le fromager. Cette déficience, traduite par une acidification insuffisante, est à l'origine de multiples défauts qui déprécient le fromage. Dans ce cas, l'emploi de cultures sélectionnées de bactéries lactiques thermophiles est toujours à recommander. Il reste à démontrer l'intérêt que pourrait présenter, à cet effet, l'emploi d'un mélange assez complexe de différentes souches de streptocoques et de lactobacilles.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur DEVOYOD de sa précieuse collaboration dans l'étude de la configuration de l'acide lactique. Nous sommes très reconnaissants envers Monsieur RAIBAUD de tous les conseils qu'il nous a aimablement donnés au cours de ce travail.

Reçu pour publication en janvier 1964.

SUMMARY

BACTERIOLOGICAL STUDY OF STARTERS USED IN GRUYERE CHEESE-MAKING

57 strains of lactobacilli and 42 strains of streptococci have been isolated from 2 samples of « présure naturelle » taken at an interval of six months in a cheese-factory in the Jura.

Among the lactobacilli, 56 strains belong to the species *Lactobacillus lactis* and one strain to *L. fermenti*. Among *L. lactis*, 11 biotypes have been distinguished by various characteristics.

Within the group of streptococci, 40 strains form an homogenous unit belonging to the species *Streptococcus thermophilus*. The other two are members of the *Str. faecalis* group.

The advantages and disadvantages of the use of the « présures naturelles » in cheese-making are discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABD-el-MALEK Y., GIBSON T., 1945. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, **14**, 35-44.

ABD-EL-MALEK Y., GIBSON T., 1948. Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, **15**, 233-248.

BARRITT M.M., 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α-naphtol. *J. Path. Bact.*, **42**, 441-454.

BRIGGS M., 1953 *a*. An improved medium for lactobacilli. *J. Dairy Res.*, **20**, 36-40.

BRIGGS M., 1953 *b*. The classification of lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 234-248.

BURRI R. von, ELSER E., 1941. Zur Kenntnis der im Emmentalerkäse auftretenden Streptokokken. *Landw. Jahrb. Schweiz*, **55**, 176-193.

BURRI R. von, KOLLMANN H., 1941. Studien über die Gattung *Thermobacterium* (ORLA-JENSEN) mit besonderer Berücksichtigung der Säuerungsflora des jungen Emmentalerkäses. *Landw. Jahrb. Schweiz*, **55**, 407-430.

COHN F., 1875 (Cité par DORNER, 1934).

DAHLBERG A. C., KOSIKOWSKI F. V., 1948. The development of flavor in American cheddar cheese made from pasteurized milk with *Streptococus faecalis* starter. *J. Dairy Sci.*, **31**, 275-284.

DICKINSON A. B., MOCQUOT G., 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. I. Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria. *J. Appl. Bact.*, **24**, 252-284.

DORNER W., 1934. Recherches sur les présures naturelles et les cultures employées en fromagerie. *Lait*, **14**, 1047-1050.

DORNER W., DEMONT P., CHAVANNES D., 1952. *Microbiologie laitière*, 126-143, Librairie Payot, Lausanne.

FREUDENREICH E. de, ORLA-JENSEN S., 1897. Ueber die Verwendung von Kunstlab und Käserei-Kultur. *Centralbl. Bakt.*, II Abt., **3**, 545-553.

FREUDENREICH E. de, 1901-1902. Les ferments lactiques et la maturation du fromage. *Revue Gen. Lait*, **1**, 289-295, 313-319, 340-346.

FREUDENREICH E. de, THÖNI J., 1904-1905. Sur l'action de différents ferments lactiques sur la maturation du fromage. *Revue Gen. Lait*, **4**, 169-181, 200-209, 225-232, 247-259.

GUITTONNEAU G., KEILLING J., BARRETT A., 1926. Les présures commerciales dans la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*, **6**, 170-180, 259-268.

KARNICKI F. von, DORNER W., 1934. Die Milchsäurebakterien flora der in der schweizerischen Käserei üblichsten Lab und Kulturarten. *Landw. Jahrb. Schweiz*, **48**, 1079-1100.

MAN J. C. de, 1956. The properties of some strains of bacteria belonging to the genus *Thermobacterium* ORLA-JENSEN. *Neth. Milk Dairy J.*, **10**, 190-198.

MOSIMANN W., 1944. Die bakterielle Besiedlung frischer und getrockneter Kälberlabmägen mit besonderer Berücksichtigung der thermophilen Säuerungsflora. *Landw. Jahrb. Schweiz*, **58**, 715-801.

ORLA-JENSEN S., 1904. Studien über die flüchtigen Fettsäuren im Käse nebst Beiträgen zur Biologie der Käsefermente *Centralbl. Bakt.*, II Abt, **13**, 428-439.(Communiqué par J. C. de MAN).

ORLA-JENSEN S., 1907. Note sur la présure et sa préparation. *Revue Gen. Lait*, **6**, 272-281.

ORLA-JENSEN S., 1919. *The lactic acid bacteria*, Host and Son, Copenhague.

RAIBAUD P., CAULET M., GALPIN J. V., MOCQUOT G., 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci : selective enumeration and differenciation of the dominant group. *J. Appl. Bact.*, **24**, 285-306.

RITTER W., 1959. Der Einfluss von Zusätzen auf das Wachstum von *Lactobacillus fermenti*. *XVe Congr. Int. Laiterie, Londres*, **3**, 1396-1401.

SHARPE M. E., 1962. Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.*, **24**, 109-118.

SWARTLING P.F., 1951. Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, **18**, 256-267.

THÖNI J., 1906. Bakteriologische Studien über Labmägen und Lab. *Landw. Jahrb. Schweiz*, **20**, 153-217.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (2), 97-103.

AUTOXYDATION DES HUILES DE PÉPINS DE RAISIN
I. — RÔLE DES TOCOPHÉROLS

P. DUBOIS

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Les tocophérols sont les principaux antioxygènes polyphénoliques naturels des lipides de réserve ou de constitution.

Préciser leur rôle au cours de l'autoxydation des huiles de pépins de raisin, c'est non seulement apporter à l'étude de ce cas particulier des renseignements utiles, mais c'est aussi apporter une contribution à l'étude des polyphénols naturels en général.

I. — INTRODUCTION

La teneur en acide linoléique des huiles de pépins de raisin est de l'ordre de 65 à 72 p. 100 (selon notamment J. Flanzy, M. Flanzy, 1959) et leur mode d'oxydation est assez semblable à celui du linoléate de méthyle que nous désignons par RH.

Selon K. U. Ingold (1962) l'oxydation des esters linoléiques RH, commence par une activation (le plus généralement du fait de la présence de métaux lourds) :

$$RH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots R^{\bullet} + (\dot{H}) \qquad (1)$$

et se poursuit par :

$$R^{\bullet} + O_2 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots ROO^{\bullet} \qquad (2)$$

$$ROO^{\bullet} + RH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots ROOH + R^{\bullet} \qquad (3)$$

L'absorption d'oxygène est alors sensiblement proportionnelle au temps. Ces trois réactions sont prédominantes lors de la phase d'induction au cours de laquelle les hydroperoxydes s'accumulent.

Ces hydroperoxydes se décomposent selon la réaction :

$$ROOH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots RO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH \qquad (4)$$

et chacun des radicaux libres est capable d'initier la formation d'un nouveau radical libre R$^{\bullet}$ à partir d'une molécule intacte d'ester linoléique RH, selon une réaction analogue à (3), et c'est essentiellement par ce mécanisme que l'oxydation devient autocatalytique.

Selon W. O. LUNDBERG (1962) l'action d'un antioxygène polyphénolique (on prendra l'exemple des tocophérols TH_2) se traduit :

— d'une part, par la réaction de stabilisation des radicaux libres oxydés :

$$ROO^{\bullet} \text{ (ou } RO^{\bullet}) + TH_2 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots ROOH \text{ (ou ROH)} + TH^{\bullet} \quad (5)$$

suivie de la réaction classique de dismutation :

$$2TH^{\bullet} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots T + TH_2 \quad (6)$$

—d'autre part, par accélération de la réaction (4), ce qui explique le rôle pro-oxygène des tocophérols et des polyphénols en général.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Dans un précédent travail, on a indiqué le mode d'obtention des huiles à partir de pépins de raisin recueillis dans les marcs frais ; de même a été indiqué le mode de dosage des tocophérols totaux. (FLANZY M., DUBOIS P., 1964.)

Ces huiles sont placées à l'étuve par quantités de 30 g, dans des Béchers de 50 ml et de 41 mm de diamètre. L'étuve est réglée à la température voulue à plus ou moins 1°C près.

Les peroxydes linoléiques se décomposent très rapidement à la chaleur selon R. T. HOLMAN

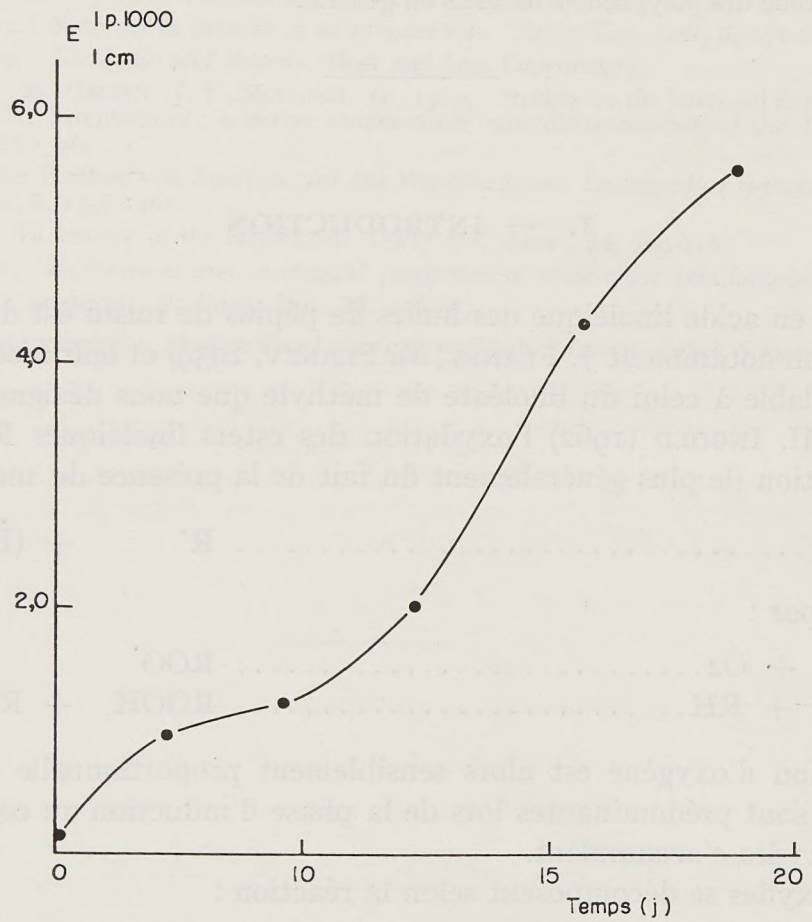


FIG. 1. — *Variations de la densité optique à 233,5 mμ à 100°C (solvant : cyclohexane)*

(1954), et l'indice de peroxydes ne peut donner d'indications réellement valables qu'aux faibles températures, ou par des dosages répétés, ce qui nécessite des quantités d'huile très supérieures à celles qui sont utilisées ici. On a, par conséquent, préféré suivre l'oxydation de l'huile par des mesures de densités optiques dans l'ultraviolet.

En effet, la formation des peroxydes linoléiques s'accompagne de la formation de diènes conjugués ayant un maximum d'absorption à 233, 5 mμ en solution dans le cyclohexane. Ces diènes conjugués sont plus stables que les fonctions peroxydes, et les variations de la densité optique à 233,5 mμ sont plus significatives que les variations de l'indice de peroxydes.

Ces diènes conjugués peuvent néanmoins donner lieu à la formation de triènes conjugués qui ont un maximum d'absorption à 270 mμ. Ces triènes conjugués sont peu stables, et donnent rapidement naissance à des produits d'oxydation secondaires.

Au cours de premières séries d'essais menés à 54°C, puis à 60 et 100°C, on a pu constater que le cépage dont provenaient les pépins n'avait pas d'influence sur la vitesse d'oxydation. On a également pu constater que les courbes de variation de la densité optique à 233,5 mμ présentaient en fin de période d'induction, un palier (fig. 1) correspondant à un ralentissement de la formation des peroxydes tout à fait analogue à celui indiqué par W. O. LUNDBERG, (1962) sur saindoux oxydé à 100°C en présence de 5 p. 1 000 de NDGA (Acide Nordihydroguaïarétique).

Il est alors apparu indispensable de suivre la teneur en tocophérols totaux au cours de l'oxydation et on indique ici les résultats obtenus à 88 et 65°C d'une part, à 20°C d'autre part, sur une huile enrichie ou non en α-*dl*-tocophérol (HOFFMANN-LA ROCHE et Cie).

Il s'agit d'une huile de pépins de Terret-Bourret (*Vitis vinifera*) (n° 1, 3 et 5)et de la même huile enrichie en tocophérol (n° 2, 4 et 6) mises à l'étuve à 88°C (n° 1 et 2), à 65°C (n° 3 et 4) et à la température du laboratoire de 20°C environ (n° 5 et 6).

III. — RÉSULTATS

1) *Résultats obtenus* à 88 *et* 65°C

Ces deux températures sont celles des parties haute et basse d'une même étuve, mais aussi deux températures situées de part et d'autre de celle de 75-80°C indiquée par W. O. LUNDBERG (1962) comme étant celle à partir de laquelle d'oxygène serait capable d'induire la réaction (1) citée en introduction, et qui est :

$$RH \ldots\ldots\ldots\ldots \quad R^{\bullet} + (\dot{H})$$

Les figures 2, 3 et 4 indiquent respectivement les variations de la teneur en tocophérols totaux, de la densité optique à 233, 5 mμ, et de la densité optique à 270mμ.

A 88°C la vitesse d'oxydation des tocophérols est beaucoup plus grande qu'à 65°C du fait de la décomposition des hydroperoxydes. Leur rôle pro-oxygène est masqué pour la même raison. Le passage de l'oxydation à la phase autocatalytique est nettement retardé par une addition de tocophérol, mais cela ne veut nullement dire que les produits d'oxydation ne s'accumulent pas.

A 65°C le passage de l'oxydation à la phase autocatalytique est inchangé, par contre, le rôle pro-oxygène des tocophérols est très net, et se manifeste surtout en début de période d'induction.

2) *Résultats obtenus à* 20°C

Ces essais n'ont pu être menés très longtemps, néanmoins c'est surtout le tout début de la période d'induction qui nous intéressait. Le rôle pro-oxygène indiqué par les courbes de variations de la densité optique à 233,5 mμ, (fig. 6) est encore plus marqué qu'à 65°C.Quant aux variations de la teneur en tocophérols indiquées figure 5

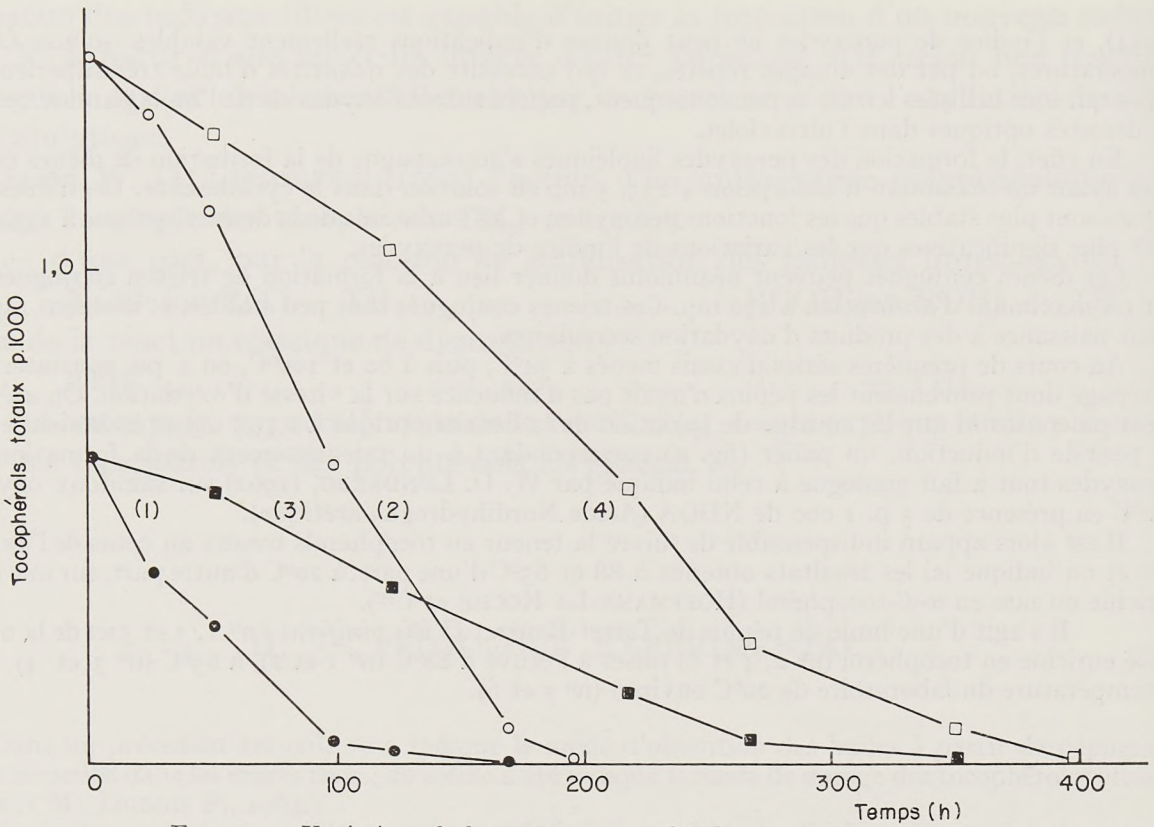


FIG. 2. — *Variations de la teneur en tocophérols totaux à 88 et 65°C.*

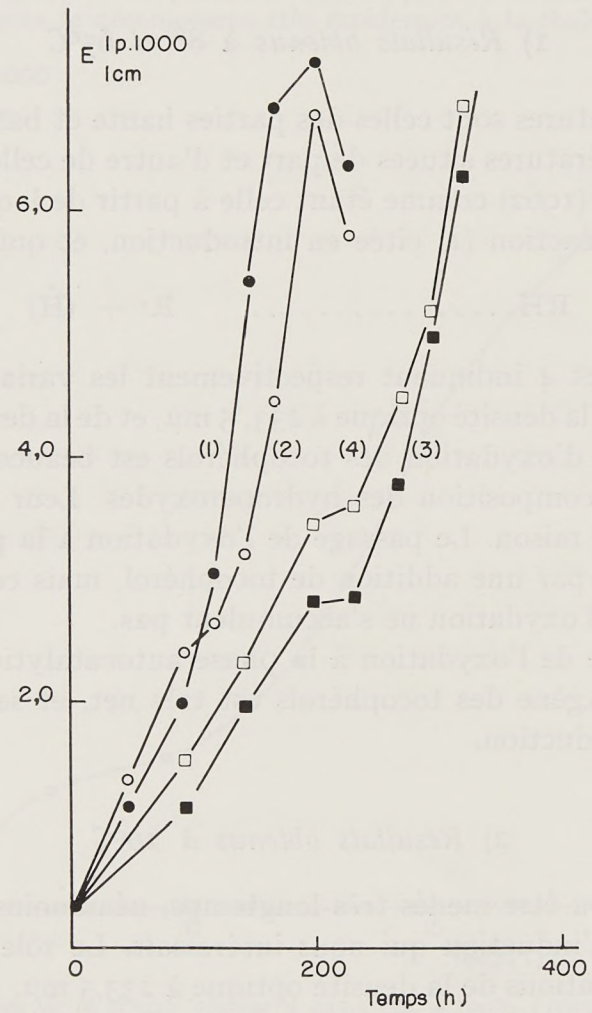


FIG. 3. — *Variations de la densité optique à 233,5 mμ à 88 et 65°C (solvant : cyclohexane)*

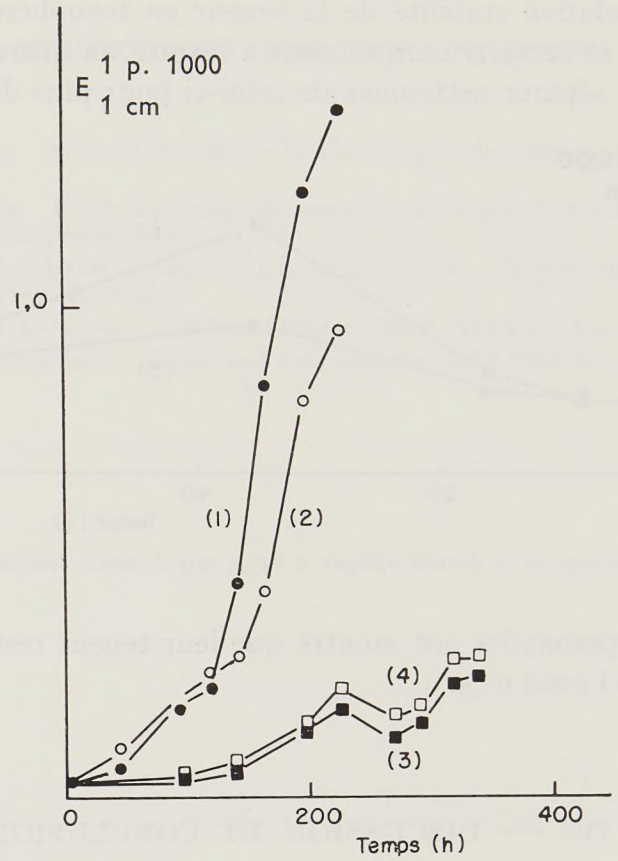


FIG. 4. — *Variations de la densité optique à 270 mμ à 88 et 65°C. (solvant : cyclohexane)*

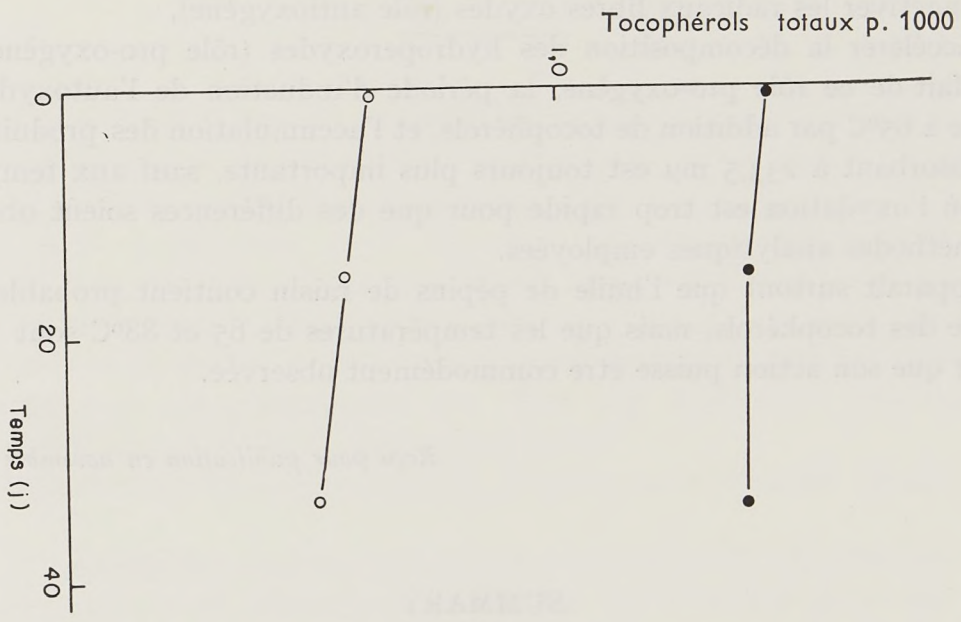


FIG. 5. — *Variations de la teneur en tocophérols totaux à 20°C.*

elles sont très faibles dans le cas de l'essai n° 6. Les essais n° 2, 3 et 4 nous avaient déjà indiqué cette relative stabilité de la teneur en tocophérols en tout début de période d'induction, et cette remarque nous a inspiré un autre travail qu'il nous a semblé préférable de séparer nettement de celui-ci pour plus de clarté.

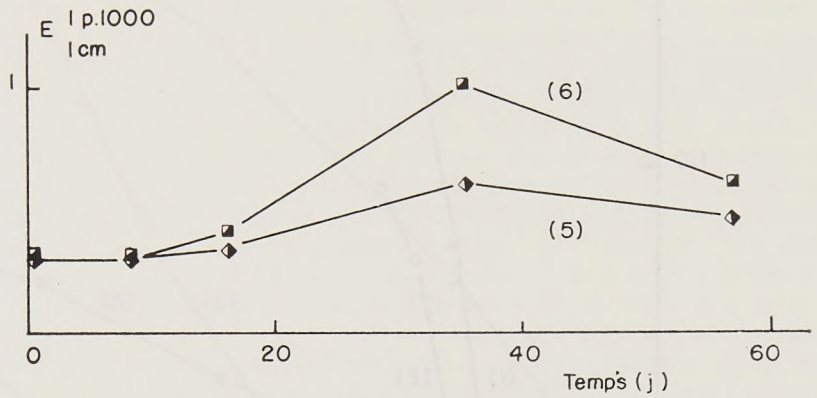


FIG. 6. — *Variations de la densité optique à 233,5 mμ à 20°C. (solvant : cyclohexane)*

Des dosages de peroxydes ont montré que leur teneur restait plus faible dans l'essai n° 6, que dans l'essai n° 5.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats sont en accord avec des données devenues depuis peu classiques, et les tocophérols ont essentiellement, dans l'huile de pépins de raisin, comme ailleurs, deux rôles :

— inactiver les radicaux libres oxydés (rôle antioxygène),

— accélérer la décomposition des hydroperoxydes (rôle pro-oxygène).

Du fait de ce rôle pro-oxygène, la période d'induction de l'autoxydation est inchangée à 65°C par addition de tocophérols, et l'accumulation des produits d'oxydation absorbant à 233,5 mμ est toujours plus importante, sauf aux températures élevées où l'oxydation est trop rapide pour que des différences soient observables par les méthodes analytiques employées.

Il apparaît surtout que l'huile de pépins de raisin contient probablement un synergiste des tocophérols, mais que les températures de 65 et 88°C sont trop élevées pour que son action puisse être commodément observée.

Reçu pour publication en novembre 1963.

SUMMARY

AUTOXIDATION OF GRAPE SEED OIL. I. EFFECT OF TOCOPHEROLS

Autoxidation of grape seed oil followed by UV spectrophotometric absorption and by determination of tocopherols' content give data in good agreement with known antioxygenic and pro-oxygenic effects of tocopherols.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLANZY J., FLANZY M., 1959. Note sur la valeur de l'huile de pépins de raisin en acides gras essentiels. *Ann. Technol. agric.*, 107-111.

FLANZY M., DUBOIS P., 1964. Étude du dosage des tocophérols. Application à l'huile de pépins de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **13** (*sous presse*).

HOLMAN R. T., 1954. Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, **2**, 51-98.

INGOLD K. U., 1962. Metal Catalysis. *Lipids and their oxidation*, AVI Publ. Co., 93-121.

LUNDBERG W. O., 1962. Mecanisms. *Lipids and their oxidation*, AVI Publ. Co., 31-50.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (2), 105-108.

AUTOXYDATION DES HUILES DE PÉPINS DE RAISIN II. — PRÉSENCE D'UN SYNERGISTE DES TOCOPHÉROLS

P. DUBOIS

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

L'auteur précise ici l'évolution de la teneur en tocophérols totaux au cours de l'oxydation d'huiles de pépins de raisin à 52°C, et précise l'action d'un synergiste des tocophérols dont la présence avait été supposée dans un précédent travail.

I. — INTRODUCTION

Dans un précédent travail on signalait en effet que dans certains cas la teneur en tocophérols d'huiles placées à l'étuve à 88 et 65°C, diminuait lentement au tout début de la période d'induction de l'autoxydation.

C. Paquot, J. Mercier, (1961) signalent une certaine stabilité de la teneur en tocophérols dans des huiles de germes de blé, mais en fin de période d'induction à 56°C, et après oxydation des deux tiers des tocophérols initialement présents.

Les courbes de variations de la teneur en antioxygènes dans les lipides au cours de leur oxydation ont généralement une allure très rapidement décroissante selon R. T. Holman, (1952) et W. O. Lundberg (1962).

On a finalement été amené à penser que ce synergisme était dû aux phospholipides.

Les phospholipides sont des constituants auxquels ont été attribuées des propriétés antioxygènes (P. Desnuelle, 1952). En fait il semble plutôt que ce soient des synergistes des antioxygènes (H. S. Olcott, 1962 ; B. N. Stuckey, 1962 ; H. S. Olcott, J. van der Veen, 1963). Leur mode d'action est en tout cas mal connu, et le simple transfert d'hydrogène indiqué par B. N. Stuckey (1962) est fortement contredit par K. U. Ingold (1962).

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET RÉSULTATS

Le mode d'obtention des huiles au laboratoire, ainsi que la méthode de dosage des tocophérols totaux ont été indiqués (M. Flanzy, P. Dubois, 1964). Ces huiles sont autoxydées dans des conditions également indiquées (P. Dubois, 1964). La température utilisée est de 52°C, car elle est à priori plus favorable que des températures plus élevées auxquelles la décomposition des peroxydes est trop rapide, ce qui entraîne une décroissance trop rapide de la teneur en tocophérols qu'il est alors difficile de suivre.

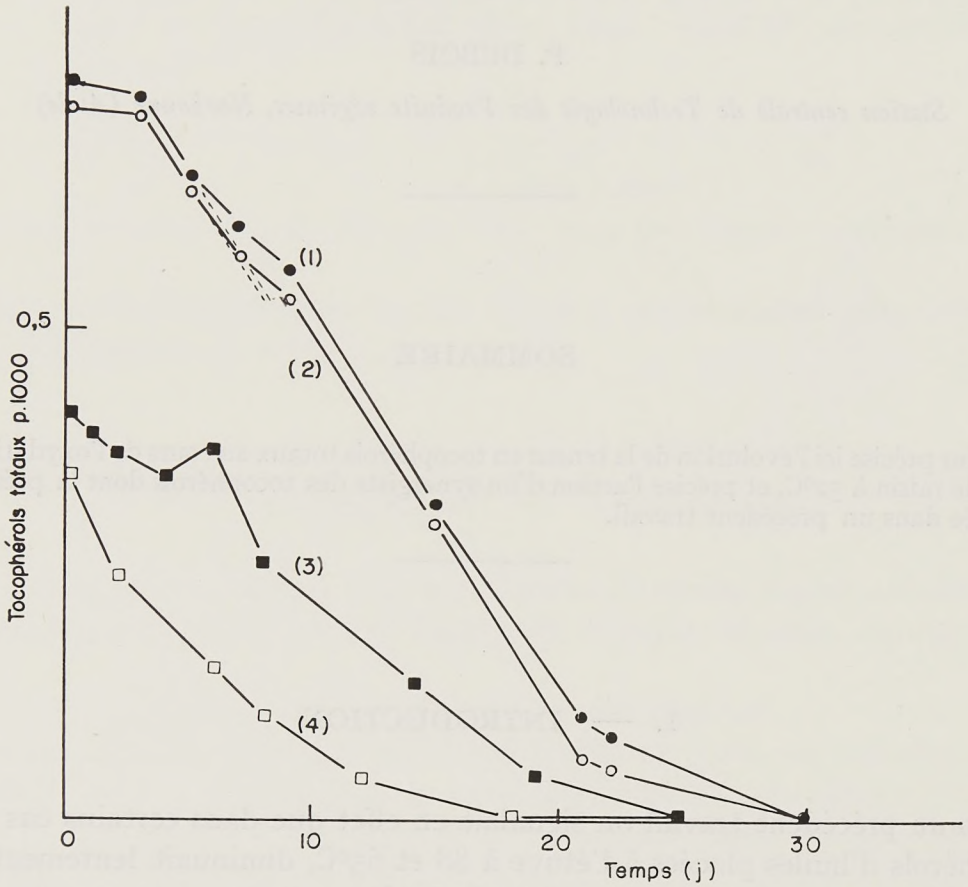


Fig. — 1. *Variation de la teneur en tocophérols totaux à 52°C.*

Quatre échantillons ont été étudiés :

N° 1. Une huile de pépins d'*Aramon* (*Vitis vinifera*) de la récolte 1963. Cette huile a été extraite la veille de la mise à l'étuve.

N° 2. Une huile d'*Aramon* de la récolte 1962, conservée sous solvant à — 5°C, en flacon bouchant émeri. Le solvant a été évaporé la veille de la mise à l'étuve.

N° 3. Une huile de pépins de *Carignan* (*Vitis vinifera*), conservée dix mois au laboratoire en flacon ouvert de temps à autre, car cette huile était utilisée pour des mises au point de dosages.

N° 4. De l'huile n° 3 filtrée sur terre à foulon en solution alcoolobenzénique en vue d'éliminer les phospholipides, lesquels ne sont élués sur cet adsorbant que par l'acide chlorhydrique à chaud, selon P. Meunier, A. Vinet, (1942).

Les faibles différences de teneur en tocophérols totaux des huilles n° 1 et 2, ainsi que les faibles différences de densité optique de ces deux huiles à 233, 5 et 270 mμ, montrent que ces deux huiles ont atteint un stade d'oxydation semblable, c'est-à-dire que l'huile n° 2 a été parfaitement conservée.

L'essai n° 4 a été entrepris quelques temps après les trois premiers, et c'est ce qui explique la

différence de teneur initiale des huiles n° 3 et 4 en tocophérols totaux, différence qui ne doit pas être imputée à une adsorption partielle sur la terre à foulon.

La figure 1 indique les résultats obtenus, les pointillés indiquant les résultats que nous nous attendions à trouver pour les essais 1 et 2.

On assiste par conséquent, non seulement à une relative stabilité de la teneur en tocophérols au tout début de la période d'induction de l'autoxydation, mais aussi, pour une huile déjà partiellement oxydée à 20°C, à une certaine augmentation de cette teneur aux cinquième et sixième jour. Ces deux phénomènes n'ont plus lieu après passage de l'huile en solution alcoolo-benzénique sur terre à foulon, et pourraient, par conséquent, avoir pour origine commune une action synergiste des phospholipides.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats sont indiqués, car des faits analogues ne sont mentionnés nulle part à notre connaissance. Leur interprétation est bien difficile dans l'immédiat.

D'autres essais restent à entreprendre sur des échantillons plus importants et permettant par conséquent des analyses plus complètes.

Un récent travail de P. P. Nair, D. A. Turner, (1963) indique des dosages possibles de l'α-tocophérol et de l'α-tocophérylquinone par chromatographie en phase gazeuse, et la réversibilité de l'oxydation des tocophérols en présence d'extrait lipidique de foie de bœuf cru. Il semble donc possible en travaillant sur des solutions de produits purs et contenant uniquement des phospholipides et de l'α-tocophérol plus ou moins oxydé, de vérifier ce rôle de synergiste par des dosages répétés à diverses températures.

Il serait également intéressant de mesurer la proportion de tocophérols oxydés lors de l'extraction de l'huile.

Reçu pour publication en novembre 1963.

SUMMARY

AUTOXIDATION OF GRAPE SEED OIL. II. PRESENCE OF A SYNERGIST OF TOCOPHEROLS

Variations of tocopherols' content in grape seed oils autoxidised at 52°C, show the presence of a synergist.

This synergism does not takes place when phospholipids have been removed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Desnuelle P., 1952. Structure and properties of phosphatides. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, **1**, 70-103.

Dubois P., 1964. Étude de l'autoxydation des huiles de pépins de raisin. I. Rôle des tocophérols. *Ann. Technol. agric.*, **13**., (*sous presse*)

Flanzy M., Dubois P., 1964. Étude du dosage des tocophérols totaux. Application aux huiles de pépins de raisin. *Ann. Technol. agric.*, (sous presse).

Holman R. T., 1954. Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, **2**, 51-98.

INGOLD K. U., 1962. Selon STUCKEY B. N., 1962, (voir ce dernier).

LUNDBERG W. O., 1962. Mechanisms. *Lipids and their oxidation.* The AVI Publ. Co., 31-52.

MEUNIER P., VINET A., 1942. Chromatographie des extraits lipoïdiques totaux des tissus en vue de la détermination de la teneur en vitamine E (tocophérol). *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **10-12**, 365-370.

NAIR P. P., TURNER D. A., 1963. The Application of Gas-Liquid Chromatography to the determination of Vitamins E and K. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **40**, nº 8, 353-356.

OLCOTT H. S., 1962. Marine Products. *Lipids and Their Oxidation,* the AVI Publ. Co., 173-189.

OLCOTT H. S., VAN der VEEN J., 1963. Role of individual phospholipids as antioxidants. *J. Food Sci.*, **28**, nº 3, 313-315.

PAQUOT C., MERCIER J., 1961. Sur la stabilité des huiles de germe de blé et leur activité antioxygène. *Rev. Fr. Corps Gras*, **8**, nº 8-9, 487-490.

STUKEY N. B., 1962. Antioxidants. *Lipids and Their Oxidation,* The AVI Publ. Co., 139-150.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (2), 109-259.

ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU MÉTABOLISME DE L'ACIDE LACTIQUE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIÆ* HANSEN [1]

P. GALZY

Station de Technologie agricole, Centre de Recherches agronomiques du Midi, École nationale supérieure agronomique, Montpellier (Hérault)

PLAN

---

[1] Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat ès Sciences naturelles soutenue le 9 Mars 1964 à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

INTRODUCTION

Les études consacrées aux levures, particulièrement à celles de boulangerie et de brasserie, ont été le plus souvent réalisées en présence de glucides comme substrat carboné. Deux raisons expliquent cet état de fait. D'une part la levure se trouve dans la nature sur des milieux riches en glucides comme les fruits. D'autre part, la levure est le premier champignon domestiqué par l'homme dans le but de transformer les glucides en alcool (brasserie, œnologie, cidrerie) et en gaz carbonique (boulangerie).

Divers auteurs ont cependant montré que la levure peut utiliser par la voie respiratoire d'autres substrats : l'acide lactique (Furth et Lieben, 1922 ; Meyerhof, 1925 ; Meyerhof et Lohman, 1926), l'acide acétique (Winzler, 1940 ; Lynen, 1942, 1943 ; Tore Levring, 1945) ou l'éthanol (Lemoigne, et *al.*, 1955). Par ailleurs, la croissance de la levure est possible sur un milieu où le seul substrat est un acide organique comme l'acide lactique ou l'acide acétique. Autrement dit, la levure peut obtenir toute l'énergie et tout le carbone nécessaires pour sa multiplication à partir de la seule molécule de l'un quelconque de ces substrats.

Au point de vue physiologique, des milliers de travaux ont été réalisés sur le métabolisme des glucides chez la levure. Il n'est pas possible de les citer tous ; des énumérations partielles ont été données dans plusieurs monographies (Ingram, 1955 ; Cook, 1958). Rappelons simplement que tous les schémas fondamentaux du métabolisme des glucides chez les cellules vivantes découlent des études effectuées sur la levure.

Au point de vue génétique, les travaux relatifs à la fermentation des glucides sont également nombreux (Lindegren, 1949 ; Hawthorne, 1955, 1960 ; Robichon-Szulmajster, de, 1956). On connaît actuellement 22 loci qui contrôlent la fermentation des glucides (Carbondale Yeast Genetics Conference, 1961). Par contre, il n'existe, à une exception près, aucun travail sur le contrôle génétique du métabolisme des substrats non fermentescibles qui sont utilisés exclusivement par la voie respiratoire (glycérol, acide acétique, acide lactique, éthanol, etc.). Les études purement physiologiques sur le métabolisme de ces substrats sont également très peu nombreuses. Les seules recherches effectuées dans ce domaine portent sur la perte du pouvoir respiratoire par les mutants « petites colonies » (Ephrussi, 1952) ; l'ensemble des travaux réalisés par l'école d'Ephrussi a permis de faire avancer les connaissances sur la respiration de la levure aussi bien au point de vue du mécanisme physiologique et enzymatique qu'au point de vue génétique. Mais rappelons que ces recherches concernent la perte de la respiration. Au moment où j'ai abordé mon travail de thèse, le probléme se posait de savoir si on pouvait obtenir des mutations ayant un effet contraire, c'est-à-dire des mutations qui augmentent ou améliorent le pouvoir respiratoire. Il était à prévoir que ces mutations, si elles existaient, devaient porter plutôt sur le métabolisme des substrats non fermentescibles comme les acides organiques. Une étude génétique et physiologique du métabolisme de ces substrats devrait apporter des renseignements utiles et complémentaires, d'une part sur le mécanisme enzymatique responsable des oxydations cellulaires et d'autre part sur les contrôles génétiques du métabolisme respiratoire.

La décision d'étudier l'acide lactique plutôt qu'un autre substrat non fermentescible (glycérol etc.) n'est pas due au hasard. Elle a été guidée par plusieurs considérations.

1. — Les lacticodéshydrogénases de la levure ont fait l'objet de nombreux travaux (APPLEBY et MORTON, 1954 ; BOERI et *al.*, 1955). Cependant, au moment où j'ai commencé ce travail, l'existence de plusieurs lacticodéshydrogénases chez la levure n'était pas connue. Depuis, les connaissances dans ce domaine ont considérablement évolué (NYGAARD, 1963). Actuellement, les lacticodéshydrogénases de la levure figurent parmi les déshydrogénases les mieux connues et les plus étudiées.

La levure cultivée en aérobiose possède deux lacticodéshydrogénases, l'une spécifique de l'acide D (—) lactique qui ne réduit que le cytochrome *c* (NYGAARD, 1960), l'autre spécifique de l'acide L (+) lactique qui réduit le ferricyanure, le 2-6 dichlorophénol-indophénol et le cytochrome *c* (BOERI, 1955), (LABEYRIE, SLONIMSKI et NASLIN, 1959). Il existe également une D-lacticodéshydrogénase chez la levure cultivée en anaérobiose (SLONIMSKI, et TYSAROWSKI, 1958) ; l'accepteur de cette enzyme *in vitro* n'est pas le cytochrome *c*, mais le ferricyanure. Il est possible que la D-lacticodéshydrogénase de la levure anaérobie soit le précurseur de la L-lacticodéshydrogénase au cours de l'adaptation respiratoire (SLONIMSKI, et TYSAROWSKI, 1958), (KATTERMANN, et SLONIMSKI, 1960).

2. — La culture prolongée de *S. cerevisiae* en présence de lactate comme seule source de carbone donne lieu à des phénomènes d' « accoutumance » (KILKENNY et HINSHELWOOD, 1951). La vitesse de croissance de certaines souches sur ce substrat augmente au cours des cultures successives et peut atteindre une vitesse proche de celle obtenue sur glucose. Les mécanismes génétiques et enzymatiques de cette accoutumance n'avaient pas été établis par les auteurs cités et méritaient donc d'être étudiés. L'obtention de mutations modifiant les propriétés des lacticodéshydrogénases présenterait un intérêt considérable. Parmi les explications possibles du phénoméne d' « accoutumance » , figure la sélection de mutants au cours des cultures successives sur acide lactique ; cette considération pouvait justifier à elle seule la réalisation d'une étude complète des mécanismes génétiques de l'accoutumance.

3. — Enfin les levures présentent au cours de leur croissance en présence de glucose des variations importantes de leur intensité respiratoire (Q_{O2}) : pendant la phase de croissance logarithmique, la respiration est très faible (EPHRUSSI, SLONIMSKI, TAVLITZKI et YOTSUYANAGI, 1956) ; elle augmente d'intensité à l'approche de la phase stationnaire. Les variations de l'intensité respiratoire peuvent s'expliquer par une action inhibitrice du glucose (SLONIMSKI, 1955 *b*) mais peut-être aussi, partiellement, par la rapidité de la multiplication durant la phase de croissance exponentielle. Il était donc intéressant d'étudier le comportement de la levure en l'absence de glucide, afin de déterminer la part revenant à l'action inhibitrice du glucose et la part revenant à la rapidité de la croissance dans les variations du pouvoir respiratoire.

Au cours de ce travail, j'ai donc essayé de répondre à trois questions :

1° Quels sont les mécanismes génétiques et enzymatiques de l' « accoutumance » de la levure à la croissance sur acide lactique comme seule source de carbone ?

2° Quelles sont les voies métaboliques empruntées pour l'oxydation de ce substrat ?

3° Quels sont les mécanismes de l'action inhibitrice du glucose sur le métabolisme respiratoire ?

Cet exposé est divisé en trois parties. Dans la première sont présentés le matériel biologique et les méthodes utilisées. La seconde est consacrée à la présentation des résultats expérimentaux. La dernière partie enfin, est une discussion générale de ces résultats.

La deuxième partie est de beaucoup la plus importante. Il me paraît indispensable de la présenter un peu plus longuement que les deux autres. Elle est divisée en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à la mise en évidence et à l'étude de l' « accoutumance » de la levure à la croissance sur acide lactique. Une lente augmentation de la vitesse de croissance se produit pendant les cultures successives sur acide lactique. Au cours de cette étude, j'ai été amené à faire des observations sur le mécanisme d'action de l'effet glucose et sur le métabolisme de l'acide lactique.

Une mutation a été sélectionnée au cours de cultures successives sur acide lactique. Les expériences qui ont permis la mise en évidence de cette mutation sont présentées dans le 2e chapitre. Cette mutation est caractérisée par la morphologie coloniale (colonie lisse) et par une vitesse de croissance supérieure sur les milieux à base d'acide lactique ; sa sélection explique le phénomène d'accoutumance.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude génétique de la mutation colonie lisse. L'étude de 18 mutants d'origine indépendante a permis la mise en évidence de sept loci et de plusieurs mutations indépendantes pour chacun de ces loci. La présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés dans l'un quelconque des loci lui confère le phénotype lisse. Les allèles mutés sont récessifs. J'ai étudié les relations de linkage entre ces divers loci ainsi que les liaisons de chacun d'eux avec le centromère.

Enfin, j'ai étudié le métabolisme des mutants comparé à celui des souches sauvages. Les résultats de ce travail sont présentés dans le quatrième chapitre. Les trois souches étudiées étaient diploïdes isogéniques : l'une était sauvage, les deux autres étaient homozygotes pour une mutation colonie lisse ; les gènes mutés étaient différents pour ces deux souches. J'ai étudié successivement le bilan de l'oxydation des acides L-lactique, D-lactique et pyruvique, leurs vitesses de respiration, l' « affinité » du système respiratoire de la cellule intacte pour ces trois substrats et l'incorporation de l'acide lactique radioactif. Les résultats obtenus ont permis de définir le mode d'action des gènes impliqués dans la mutation colonie lisse et de compléter les observations faites dans le premier chapitre sur le métabolisme de l'acide lactique.

Dans chaque chapitre, les résultats expérimentaux sont suivis d'une discussion partielle. La troisième partie est consacrée à une discussion plus générale des résultats. Les connaissances acquises sur le métabolisme de l'acide lactique chez la levure et sur l'action inhibitrice du glucose sur la biosynthèse des enzymes respiratoires y sont d'abord résumées. Puis, sont dégagés les enseignements que l'étude de la mutation colonie lisse peut apporter sur le mode d'action des gènes intéressés.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées avec diverses souches haploïdes de *Saccharomyces cerevisiae*.

— 59 R est issue d'une ascospore isolée à l'aide du micromanipulateur de Fonbrune à partir de la levure de boulangerie B II au laboratoire de génétique physiologique du C. N. R. S. (Ephrussi, Hottinguer, Chimenes, 1949). Elle ne présente pas de besoins particuliers en facteurs de croissance à part la biotine et l'acide pantothénique. Elle est de signe *a*.

— 276/3*d* également a besoin de biotine et d'acide pantothénique (Ephrussi, Hottinguer, et Tavlitski, 1949). Elle est de signe *a*.

Les deux souches précédentes ont été choisies parce que leur métabolisme et leur constitution enzymatique sont bien connus (Slonimski 1953). Quatre autres souches ont été utilisées, qui exigent divers facteurs de croissance, en plus de la biotine et de l'acide pantothénique. Il s'agit de :

— 276/3*br*. Facteurs de croissance indispensables : thiamine et adénine (Ephrussi, Hottinguer, et Tavlitski, 1949). Le signe est α.

— 1 258/7*a*. Facteurs de croissance indispensables : méthionine, histidine, tryptophane (Robichon Szulmajster, de, 1956). Elle est de signe *a*.

— 6 153/C9. Facteurs de croissance indispensables : uracile, adénine, histidine (Clavilier, 1962). Elle est de signe α.

— 4 021/D3. Facteurs de croissance indispensables : tryptophane, méthionine, adénine, histidine (Clavilier, 1962). Cette dernière souche est de signe *a*.

Le génotype de ces souches et les avantages particuliers que présente l'utilisation de chacune d'entre elles seront précisés au cours du travail.

II. — Conditions de culture

A. — Milieux de culture

a) *Préparation du milieu G*

La fabrication des milieux de culture synthétiques est effectuée en deux étapes : diverses solutions mères stériles sont d'abord préparées ; puis les milieux sont obtenus à partir de ces solutions au moment de l'emploi.

1. — *Préparation des solutions stocks.*

Solution de sels minéraux. — PO_4KH_2 (pur cristallisé Prolabo) : 10 g. — $PO_4NH_4H_2$ (RP Prolabo) : 60 g. — $SO_4(NH_4)_2$ (RP Prolabo) : 20 g. — NaCl (RP Prolabo) : 1 g. — $SO_4Mg, 7H_2O$ (RP Prolabo) : 5 g. — $CaCl_2$ anhydre (Mallinckrodt Chemical Works) : 1 g. — Eau bidistillée q. s. p. : 1 000 ml. La stérilisation se fait à 120° en 20 minutes.

Solution de vitamines (produits Hoffmann La Roche). — Pantothénate de calcium : 80 mg. — Thiamine : 80 mg. — Inositol : 80 mg. — Pyridoxine : 80 mg. — Acide nicotinique : 20 mg. — Biotine : 0,8 mg. — Eau bidistillée q. s. p. : 200 ml.

La stérilisation s'effectue sur ultrafiltre en éliminant les premiers ml passés.

Solution de chlorure ferrique. — Il est préparé une solution mère à 2 g/l.

Cette solution est ensuite diluée 10 fois. La stérilisation se fait en 20 mn à 120°.

Le chlorure ferrique utilisé est la solution RP Prolabo de densité 1,26.

Solution d'oligoéléments. — Acide borique (RP Prolabo) : 500 mg. — Sulfate de cuivre (RP Prolabo) : 40 mg. — Iodure de potassium (RP Prolabo) : 100 mg. — Sulfate de manganèse (RP Prolabo) : 400 mg. — Molybdate de sodium (RP Prolabo) : 200 mg. — Sulfate de zinc (RP Prolabo) : 400 mg. — Eau bidistillée q. s. p. : 1 000 ml.

La stérilisation s'effectue à 120° en 20 minutes.

Solutions de substances carbonées. — La solution de glucose est à 55 g par litre de glucose monohydraté cristallisé (Dextrosol, fabriqué par la Société des Produits du Maïs).

La solution d'acide D, L-lactique est à 50 g/litre, le pH étant ramené à 4,5 à l'aide d'une solution concentrée de potasse. On utilise l'acide lactique pur, densité 1,24, fabriqué par Prolabo.

Ces solutions sont stérilisées à 110° pendant 40 mn.

Solutions de facteur de croissance. — L'histidine est préparée dans l'eau bidistillée, histidine : 550 mg dans 10 ml H_2O. — L'adénine est dissoute dans l'acide chlorhydrique 0,05 N, adénine : 550 mg dans 250 ml HCl 0,05 N. Les autres substances sont dissoutes dans une solution à 0,5 p. 100 de CO_3HNa. — L-tryptophane : 550 mg dans 100 ml. — D, L-méthionine : 1 100 mg dans 100 ml. — Uracile : 550 mg dans 100 ml.

Ces différentes substances proviennent de chez Hoffmann La Roche.

2. — *Milieu de base.*

Un milieu de base est d'abord préparé stérilement (milieu G) : eau bidistillée : 1 600 ml. — Sels minéraux : 200 ml. — Oligoéléments : 2 ml. — Vitamines : 10 ml. — Chlorure ferrique : 2 ml. Le chlorure ferrique doit être ajouté en dernier lieu.

3. — *Milieu liquide.*

Au moment de l'utilisation, on ajoute à ce milieu 10 p. 100 d'une solution de substances carbonées (glucose ou acide lactique). On désignera ces milieux complets suivant le substrat ajouté : G lactate ou G glucose.

Éventuellement, on ajoute les facteurs de croissance nécessaires pour la souche étudiée : 5 p. 100 de la solution d'adénine, 2 p. 100 des solutions de tryptophane uracile et méthionine et 0,2 p. 100 de la solution d'histidine.

4. — *Milieu gélosé.*

Les milieux précédemment décrits, peuvent être gélosés à 4 p. 100, leur pH ayant été amené par addition d'une solution concentrée de potasse aux environs de pH = 5 à 6. Après autoclavage 40 mn à 110°, le milieu est réparti en boîtes de Pétri. Lorsque la source de carbone est l'acide lactique, on appellera ce milieu GA ; lorsque la source de carbone sera le glucose on l'appellera GB. On ajoutera à cette désignation, entre parenthèses, des abréviations indiquant les facteurs de croissance particuliers ajoutés au milieu de base : adénine (*ad*) méthionine (*m*) tryptophane (*t*) uracile (*ur*) histidine (*h*). Par convention on appellera milieu complet le milieu contenant tous les facteurs de croissance nécessaires pour toutes les souches impliquées dans une expérience.

b) *Préparation du milieu C*

J'ai également utilisé le milieu gélosé suivant Yeast extract Difco : 5 g. Acide lactique : 10 ml. — Eau distillée : 1 000 ml. — Gélose : 40 g. — pH (réglé à la potasse) ≠ 6.

Stérilisation 20 mn à 120°. — Le milieu est utilisé en boîtes de Pétri.

c) *Préparation du milieu YGA*

Sa composition est la suivante : Yeast extract Difco : 5 g. — Acide acétique : 10 ml. — Glucose : 2 g. — Eau distillée : 1 000 ml. — Gélose : 40 g. — pH (réglé à la potasse) ≠ 6. Après stérilisation à 120° pendant 20 mn on coule en boîtes de Pétri

B. — Techniques de culture

Les cultures sont effectuées en général à 25° avec agitation (100 oscillations/minute, amplitude 5 cm) dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume. Cependant les cultures effectuées en vue de l'étude enzymatique des souches ont été réalisées dans des bouteilles de 10 l contenant 1,5 litre de milieu de culture et tournant horizontalement autour de leur axe à 150 tours/minute.

Des cultures ont été également conduites en tube à barbotage d'air, l'aération étant effectuée à travers une plaque de verre fritté.

Ces diverses techniques assurent une excellente aération du milieu et évitent la sédimentation des cellules.

C. — Étude de la croissance

La croissance a été suivie par mesure des densités optiques à l'électrophotomètre de Meunier. Afin d'éviter les prélèvements au cours de la croissance un dispositif spécial a été ajouté au Meunier, permettant la lecture des densités optiques dans les tubes (Galzy, 1958). Les cultures (10 ml) se font dans des erlenmeyers de 100 ml munis latéralement d'un tube à essais ; le tube permet une lecture directe dans le Meunier modifié.

Les mesures sont exprimées en mg de matière sèche par ml. Rappelons qu'une division du tambour de l'électrophotomètre Meunier correspond à une teneur en matière sèche de 0,5 mg par litre et à une population d'environ 0,05 million de cellules par ml.

III. — Techniques manométriques

Les techniques manométriques sont effectuées suivant la méthode classique de Warburg (Umbreitt et coll., 1949). Les déterminations sont faites à 28° sur des cellules mises en suspension dans un tampon phosphate monopotassique M/15 pH = 4,5. Sauf mention spéciale le volume du liquide est de 2 ml par fiole. L'absorption du CO_2 est effectuée par 0,2 ml de potasse à 20 p. 100 placé dans le diverticule central ; pour augmenter la surface on ajoute un carré (1,8 × 1,8 cm) de papier filtre plié.

L'agitation des manomètres est de 180-230 oscillations simples par minute, arc de 7 cm.

Les fioles et les manomètres sont jaugés avec du mercure à 0,02 cm^3 près; le volume total des fioles varie de 10 à 21 cm^3 .

Le volume de CO_2 dégagé dans l'air est mesuré par la méthode directe de Warburg : on ne fait pas de correction pour la rétention du CO_2 qui est négligeable à pH = 4,5.

L'anaérobiose est réalisée en faisant passer dans les fioles, pendant 20 minutes, un courant d'azote R de la société « Air liquide ».

La durée maxima des expériences manométriques est de 7 heures. Dans les conditions de ces expériences la contamination bactérienne est négligeable.

Toutes les mesures effectuées sont ramenées au mg de matière sèche. La matière sèche des suspensions est déterminée en mesurant la densité optique au spectrophotomètre Jobin et Yvon ou à l'électrophotomètre Meunier. Pour les souches de levure qui donnent des grumeaux, on effectue la réaction du biuret selon Strickland; un étalonnage effectué pour chaque souche donne la correspondance biuret-matière sèche.

Les valeurs manométriques sont données selon le principe :

$$Q \begin{cases} \text{Atmosphère} \\ \text{Gaz étudié} \end{cases} \text{(substrat carboné)}$$

L'exposant indique l'atmosphère utilisée au cours des mesures.

Quand l'atmosphère est l'air, il n'en est pas fait mention.

Le gaz dont on mesure les variations de volume est en indice.

Q_{CO_2} fermentaire exprime le nombre de mm^3 de CO_2 dégagé par fermentation dans l'air :

$$Q_{CO_2} \text{ ferm.} = Q_{CO_2} - Q_{O_2}.$$

J'ai utilisé pour ces déterminations une solution de glucose à 10 p. 100 (glucose pur Prolabo). La vitesse de respiration de l'acide lactique a été mesurée avec une solution à 10 p. 100 d'acide lactique pur Prolabo ramenée à pH = 4,5 à l'aide d'une solution concentrée de potasse ; l'acide lactique Prolabo étant un mélange d'acide L-lactique et d'acide D-lactique en quantité variable. Je n'ai pas mentionné la nature exacte de l'acide lactique (L, D ou DL), chaque fois que ce type de solution a été utilisé.

Une solution de D-lactate de sodium 0,34 M a été préparée à partir de D-lactate de calcium de la California Biochemical Corporation. Le lactate de calcium est d'abord dissous dans une solution d'acide chlorhydrique, à 2,5 p. 100. Par addition de phosphate disodique cristallisé jusqu'à saturation, on élève le pH et on précipite le phosphate de calcium. Le dépôt de phosphate de calcium est éliminé par centrifugation. La solution de lactate de sodium ainsi obtenue, est exempte de calcium ; elle est placée à — 5°. L'excès de phosphate disodique précipite à cette température. La solution est décantée ; son pH est alors voisin de 5,2. J'ai préparé également une solution 3,4 mM en diluant dans le tampon phosphate M/15 ; pH = 4,5.

Des solutions de L-lactate de sodium ont été préparées suivant la même méthode que les solutions de D-lactate en utilisant le L-lactate de calcium de la California Biochemical Corporation.

Les solutions d'acide D, L-lactique ont été préparées en mélangeant en quantité égale des solutions de même molarité d'acide L-lactique et d'acide D-lactique.

J'ai utilisé l'acide pyruvique Serlabo à 95 p. 100 de densité 1,26. pour préparer une solution 0,34 M, le pH étant ajusté à 4,5 à l'aide d'une solution de potasse. Par dilution dans du tampon phosphate M/15, pH = 4,5 j'ai préparé également une solution 3,4 mM. Le titre de ces solutions a été vérifié en utilisant la méthode de dosage de l'acide pyruvique de FROMAGEOT (1935).

IV. — Techniques enzymologiques

Les cellules de levure sont mises en suspension dans du tampon phosphate M/10, pH = 7,2 ; 4 ml de suspension sont broyés au contact de 8 g de billes de verre (bellotini n° 18) (diamètre 0,05 à 0,15 mm) dans un flacon bouchon émeri d'une capacité de 100 cm^3. Le flacon est agité 30 minutes à l'aide d'un agitateur ultra-rapide (J. W. TOWERS and Co) placé dans une chambre froide. Le broyat est ensuite décanté ; pour reprendre quantitativement le contenu il faut laver les billes de verre, plusieurs fois avec de petites quantités de tampon, jusqu'à un volume final de 8 ml. Une centrifugation à 4°, 5 minutes, 3 000 tours/minute, est réalisée pour éliminer les débris cellulaires et les cellules intactes.

La teneur en protéines des broyats est déterminée grâce à la réaction du biuret selon STRICKLAND (1951).

Les activités enzymatiques sont données en unité Beckman par minute et par mg de protéines de la prise d'essai, le volume total de réactif dans les cuves de Beckman étant 3 ml. Les cuves utilisées ont 1 cm d'épaisseur. On trouvera ci-dessous la technique utilisée pour chaque enzyme : f est l'ouverture de la fente et λ la longueur d'onde à laquelle les mesures sont effectuées.

Fumarase : Le dosage est effectué d'après HIRSCH (1952) : $\lambda = 240$. — $f = 0,5$. — Malate 0,664 M ; pH 6,9 : 0,1 ml. — Tampon phosphate M/5 ; pH 7,55 : 2,8 ml — Broyat : 0,1 ml.

Alcool déshydrogénase : Elle est mesurée par la réduction du DPN d'après RACKER (1955) : $\lambda = 340$. — $f = 0,16$. — Éthanol 5 M : 0,05 ml. — Pyrophosphate de Na 0,06 M : 0,5 ml. — DPN à 10 mg/ml : 0,05 ml. — Eau : 2,3 ml. — Broyat dilué convenablement dans du tampon phosphate : 0,1 ml.

Déshydrogénase isocitrique liée au DPN : Elle est mesurée par la réduction du DPN d'après KORNBERG (1955) : $\lambda = 340$. — $f = 0{,}16$. — Tampon phosphate 0,5 M ; pH = 7 : 0,2 ml. — SO_4Mg 0,05 M : 0,1 ml. — Adénosine 5′ phosphate 0,005 M : 0,1 ml. — DPN : 0,1 ml. — D, L-isocitrate à 1 mg/ml : 0,1 ml. — Eau : 2,3 ml. — Broyat : 0,1 ml.

Déshydrogénase isocitrique liée au TPN : La technique selon KORNBERG (1955) est basée sur la mesure de la réduction du TPN : $\lambda = 340$. — $f = 0{,}16$. — Tampon phosphate 0,5 M ; pH = 7 : 0,2 ml. — SO_4Mg ; 0,05 M : 0,2 ml. — TPN à 1,3 mg/ml : 0,1 ml. — D, L-isocitrate : 0,1 ml. — Eau : 2,4 ml. — Broyat : 0,1 ml.

6 *phosphogluconate TPN déshydrogénase :* Elle est dosée suivant HORECKER et SMYRNIOTIS (1955) : $\lambda = 340$. — $f = 0{,}16$. — SO_4Mg 0,05 M : 0,8 ml. — 6 phosphogluconate de calcium à 9 mg/ml : 0,4 ml. — Tampon glycil-glycine 0,04 M, pH = 7,5 : 0,5 ml. — TPN : 0,1 ml. — Eau : 1,1 ml. — Broyat : 0,1 ml.

Glucose 6 *phosphate TPN déshydrogénase :* La technique selon KORNBERG et HORECKER est la même que la précédente. Le glucose 6 phosphate de baryum (0,4 ml par cuve) est à 12,5 mg/ml.

Succino-cytochrome c *déshydrogénase :* On mesure selon SLONIMSKI (1953) la réduction du cytochrome *c* pour : $\lambda = 551$ et $f = 0{,}035$. — Succinate 0,5 M, pH = 6,9 : 0,2 ml. — Tampon phosphate pH = 7 ; 0,5 M : 0,2 ml. — Cytochrome *c* à 10 mg/ml : 0,2 ml. — Eau : 2,2 ml ; au dernier moment KCN M/10 pH = 7 : 0,1 ml. — Broyat : 0,1 ml.

Lactico cytochrome c *déshydrogénase :* La technique selon SLONIMSKI (1953) est identique à la précédente. Le substrat est de l'acide D, L-lactique à 10 p. 100, pH = 6,5.

Lorsque ces dosages ont été effectués, la présence de deux lacticodéshydrogénases stéréospécifiques chez la levure n'était pas connue. Les activités mesurées par cette méthode ne distinguent donc pas entre la L-lacticodéshydrogénase (LABEYRIE, SLONIMSKI et NASLIN, 1959) et la D-lacticodéshydrogénase (NYGAARD, 1961). Cependant, il est connu que cette dernière enzyme est extrêmement sensible à la force ionique de la solution au cours de la mesure (NYGAARD, 1961). Dans ces conditions, il est permis de penser que les résultats obtenus indiquent en première approximation l'activité de la L-lacticodéshydrogénase.

Pour chaque enzyme, l'activité endogène du broyat en l'absence de substrat a été mesurée et retranchée de l'activité totale.

Le broyat est dilué pour les enzymes très actives : la prise d'essai est prévue de telle sorte que la quantité d'enzyme soit le seul facteur limitant de la réaction. Enfin, il a été vérifié que l'activité de toutes les enzymes étudiées reste stable pendant la durée des opérations. Les suspensions de levure sont conservées congelées entre la fin de la culture et le broyage. Les broyats sont conservés dans la glace pendant les mesures et, éventuellement, congelés pendant la nuit. Tous les tests sont effectués dans les 30 heures qui suivent le broyage.

V. — Techniques génétiques

A. — Croisements

Les deux souches à croiser sont ensemencées dans un tube à essais contenant un milieu de culture liquide (yeast extract 0,5 p. 100, glucose 0,5 p. 100). Après 24 heures, on observe de nombreuses figures de copulations.

Si les deux souches présentent des besoins en facteurs de croissance différents, on étale la culture sur un milieu GB ne contenant pas ces facteurs. mais pouvant contenir éventuellement les facteurs dont les deux souches ont besoin ; on appellera un tel milieu dans la suite du travail : milieu « minimum ».

Dans ces conditions les cellules diploïdes issues du croisement donnent une colonie alors que les parents haploïdes ne poussent pas. Il est donc facile d'isoler le diploïde issu du croisement.

Dans le cas où les deux souches à croiser n'ont pas des besoins différents, on isole une figure de copulation sous le microscope à l'aide d'une microaiguille.

B. — Dissection des asques

Les souches diploïdes obtenues sont mises à sporuler sur milieu de Fowel modifié : Acide acétique : 7 ml. — Yeast extract : 2 g. — $SO_4Mg, 7\,H_2O$: 0,2 g. — pH réglé à 7 à la potasse. — Gélose : 15 g. — Eau : 1 000 ml.

La dissection des asques est effectuée au micromanipulateur en chambre de Hawthorne suivant la technique de Johnston et Mortimer (1958). Il est possible d'effectuer ainsi l'analyse des tétrades.

J'ai également utilisé une technique permettant la dissection en masse : les asques sont mis en suspension dans l'eau en présence de glycuronidase (2 000 unités/ml) ; la paroi des asques est rapidement dissoute dans ces conditions. On effectue l'extraction des spores de la suspension par l'huile de paraffine (0,5 ml de paraffine pour 0,5 ml d'eau). On agite fortement puis on centrifuge pour briser l'émulsion. La paraffine entraîne les spores tandis que les levures présentes dans la suspension, demeurent dans l'eau. Après deux lavages à l'eau on obtient une suspension très pure de spores dans la paraffine. Cette suspension peut être étalée sur boîte de Pétri ; chaque colonie obtenue est d'origine monosporale.

Les étalements sont effectués sur milieu YGA.

C. — Ségrégation des marqueurs

Les souches utilisées dans les croisements diffèrent par leurs besoins en facteurs de croissance ; ces derniers sont contrôlés par un seul gène. L'étude de leur ségrégation peut permettre de tester les tétrades et de déceler soit des segrégations abérrantes, soit éventuellement des contaminations.

On ensemence les souches sur un milieu GB contenant tous les facteurs de croissance moins un, et gélosé seulement à 2 p. 100 ; on creuse au tamponnoir 16 trous dans chaque boîte de Pétri. Les souches sont mises en suspension dans l'eau physio-

logique et chaque trou d'une boîte reçoit une goutte d'une suspension différente. On peut donc tester 16 souches (soit 4 asques) par boîte. On étudie également la ségrégation du signe en croisant avec une souche test (WY 91. α. Arginine—. Leucine—).

La copulation est détectée par examen au microscope d'une part et par la possibilité de la culture de pousser sur milieu minimum d'autre part.

VI. — Mesure de la radioactivité

A. — Préparation des échantillons

J'ai utilisé deux souches de levures diploïdes n° 4 et 183 (cf. chapitre IV). A partir de ces deux souches, j'ai obtenu des mutants à déficience respiratoire (petite végétative) appelés respectivement 4 p_3 et 183 p_3.

Les souches 4 et 183 ont été cultivées sur milieu G glucosé ; la vitesse et le rendement de croissance des levures à déficience respiratoire étant faibles, j'ai cultivé les souches 4 p_3 et 183 p_3 sur le milieu suivant : glucose 2 p. 100 ; yeast extract Difco 0,5 p. 100. Les cultures ont été arrêtées en fin de croissance exponentielle ; après centrifugation et lavage avec un tampon phosphate M/15, pH = 4,5,la levure est mise en suspension dans le tampon phosphate.

B. — Incubation et marquage

Les solutions radioactives sont mises à incuber au bain-marie à 28° dans des tubes à essai qui contiennent chacun 0,9 ml de solution. La levure est ajoutée dans les tubes au temps zéro ; la densité de la suspension est prévue de manière que la prise d'essai (0,1 ml) contienne environ 1 mg de matière sèche.

C. — Filtration

Dans chaque expérience, quatre tubes à essais sont préparés dans des conditions rigoureusement identiques. Le contenu de chacun d'eux est filtré sur membrane millipore respectivement aux temps zéro, 5 mn, 10 mn et 20 mn. Après filtration, j'ai lavé avec 25 ml de tampon phtalate de sodium, 0,05 M à 0 degré. J'ai utilisé les membranes millipores HA 25 mm, pore 0,45 μ. Chaque membrane est fixée sur une coupelle d'aluminium et desséchée sous infra-rouge.

D. — Comptage et mesure de la radioactivité

J'ai utilisé un compteur Tracerlab type gaz flow à fenêtre Myler. Le rendement des comptages était d'environ 15 p. 100, 3 000 coups sont comptés pour chaque coupelle (en trois séries de 1 000 coups) ; l'erreur standard sur le comptage est dans ces conditions d'environ 2 p. 100. Pour une expérience déterminée, j'ai mesuré la radioactivité d'une source connue afin de contrôler la fidélité de l'appareil et celle d'une quantité connue de la solution radioactive utilisée après l'avoir desséchée à la surface d'une coupelle de hauteur et de forme identiques à celles servant pour la fixation des membranes millipores.

E. — Préparation des solutions radioactives

J'ai utilisé l'acide lactique radioactif de la California Biochemical Corporation. L'acide D, L-lactique 2 C^{14} d'activité spécifique 2,7 mc/mM a permis de préparer une solution mère contenant 10 µc/ml. L'acide L-lactique 1 C^{14} d'activité spécifique 5 mc/mM a donné une solution mère à 5 µc/ml. A partir de ces stocks, diverses solutions d'expérience ont été préparées en diluant avec des solutions d'acide lactique D ou L et en tamponnant à pH = 4,6 avec du tampon phtalate de Na 0,05 M. Toutes les solutions d'expérience sont filtrées sur membrane millipore avant utilisation. La composition détaillée des solutions d'expérience sera fournie dans le chapitre IV.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

MISE EN ÉVIDENCE DE L'« ACCOUTUMANCE » DE LA LEVURE A LA CROISSANCE SUR ACIDE LACTIQUE

I. — Introduction

La croissance prolongée de la levure sur acide lactique comme seule source de carbone s'accompagne d'une augmentation progressive de la vitesse de croissance d'après KILKENNY et HINSHELWOOD (1951). Le travail expérimental décrit dans ce premier chapitre a eu pour but essentiel la mise en évidence de phénomènes d' « accoutumance » du type cité par KILKENNY. J'ai trouvé une augmentation progressive de la vitesse de croissance sur acide lactique pour plusieurs souches. Ce phénomène sera désigné par le terme volontairement imprécis d' « accoutumance », jusqu'à la mise en évidence de son mécanisme génétique (cf. chapitre II). De plus, j'exposerai dans ce chapitre une série d'expériences préliminaires destinées à orienter le travail. Les mécanismes de l' « accoutumance » n'ont pas été étudiés systématiquement ici ; ils seront décrits plus en détail dans les chapitres II et IV.

II. — Étude de la croissance

A. — Essais d' « accoutumance »

L'étude de l' « accoutumance » de la levure à la croissance sur acide lactique comme seule source de carbone a été effectuée avec 4 souches :

59 R — 276/3*d* — 276/3*br* — 1 258/7*a*

Les souches d' « origine » sont conservées sur un milieu gélosé à 2 p. 100 à base de Yeast extract Difco (0,5 p. 100) et de glucose (0,5 p. 100). Chacune est ensemencée sur le milieu synthétique à base d'acide lactique ; un erlenmeyer de 50 ml contient 5 ml de culture et subit une aération vigoureuse par agitation à 28° (cf. première partie, § II). Dix repiquages successifs ont été réalisés. La durée de chaque culture est de trois ou quatre jours ; l'ensemencement est égal à 1/25 du volume de la culture.

L'ensemble de l'expérience représente environ 50 générations effectuées au contact du même substrat.

Les souches ainsi « accoutumées » sont mises en stock sur un milieu gélosé obtenu en mélangeant en parties égales de l'eau distillée gélosée à 4 p. 100 et le milieu d'expérience.

B. — Étude du rendement de croissance

L'étude du rendement de croissance sur acide lactique a été réalisée pour la souche 59 R « origine » et « accoutumée ». Ces rendements ont été déterminés avec le milieu synthétique habituel pour plusieurs concentrations de l'aliment carboné

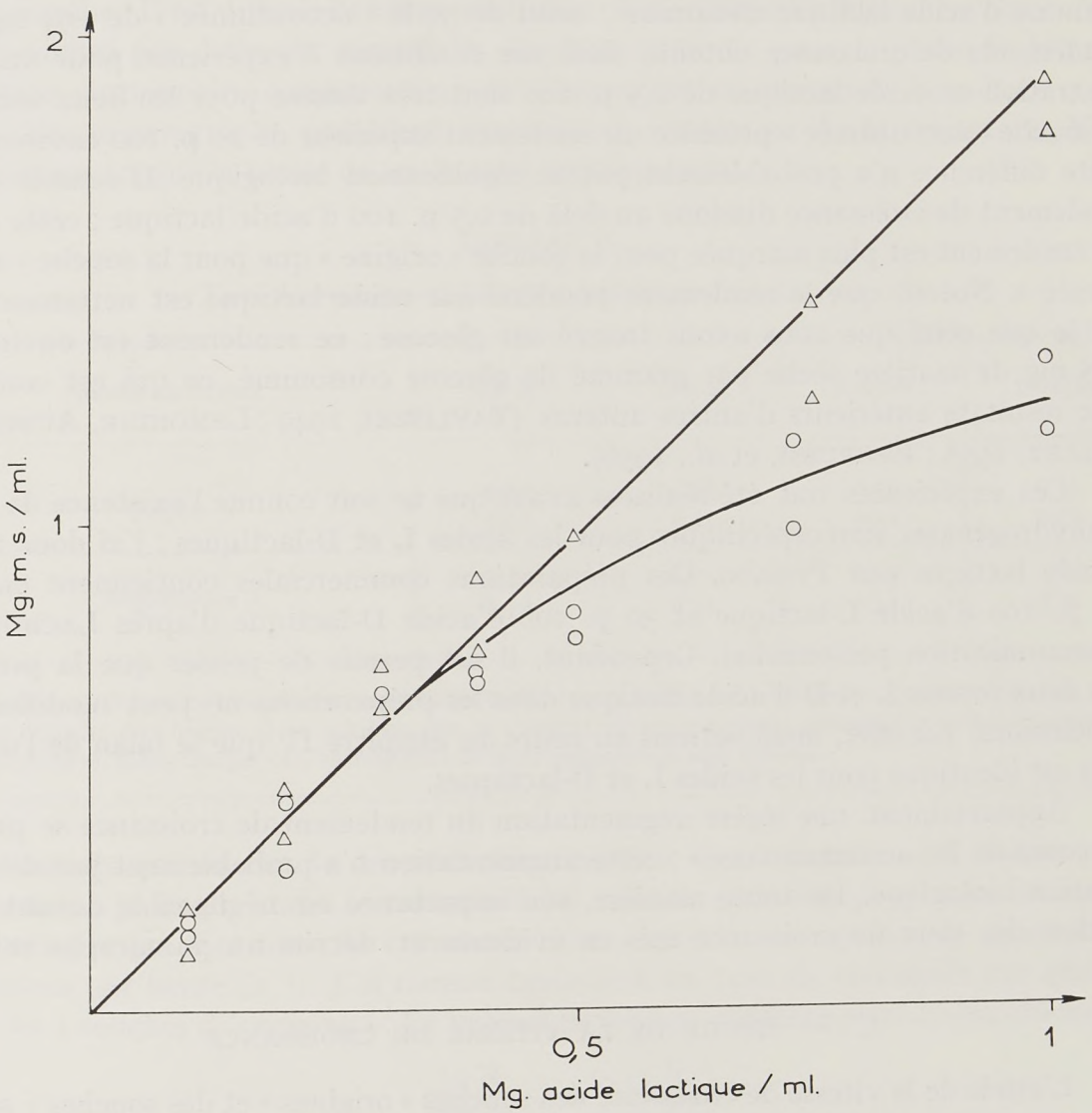


Fig. 1. — *Étude du rendement de croissance de la levure sur acide lactique*
En abscisse : acide lactique contenu dans 1ml de culture, exprimé en mg.
En ordonnée : matière sèche, en fin de croissance, par ml de culture, exprimée en mg.
Cercles : souche 59 R « origine »
Triangles : souche 59 R « accoutumée »

échelonnées de 0,1 p. 100 à 1 p. 100. Les cultures sont effectuées en erlenmeyer de 100 ml contenant 10 ml de milieu et agitées à 28°. Pour chacune des deux souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée », une préculture est réalisée sur milieu synthé-

tique glucosé ; la préculture est centrifugée. Après 2 lavages, la levure est mise en suspension dans l'eau distillée. Les cultures d'expérience sont ensemencées avec 0,02 mg de matière sèche par ml à l'aide de ces suspensions. J'ai mesuré la quantité de levure contenue dans les flacons d'expérience à la fin de la croissance pour déterminer ainsi la croissance maximale c'est-à-dire le rendement de la croissance. Toutes les déterminations ont été effectuées en double.

Il existe une relation linéaire entre la concentration de l'aliment carboné et la croissance totale pour les concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 p. 100 (fig. 1). Cette relation indique que la concentration de l'acide lactique est le seul facteur limitant de la croissance dans nos expériences où la concentration était de 0,5 p. 100.

Le rendement de la souche 59 R « origine » est de 157 mg de matière sèche par gramme d'acide lactique consommé ; celui de 59 R « accoutumée » de 194 mg. Les rendements de croissance obtenus dans nos conditions d'expérience pour une concentration en acide lactique de 0,5 p. 100 sont très voisins pour les deux souches ; la souche « accoutumée » présente un rendement supérieur de 20 p. 100 environ mais cette différence n'a probablement pas de signification biologique. Il semble que le rendement de croissance diminue au-delà de 0,5 p. 100 d'acide lactique ; cette baisse de rendement est plus marquée pour la souche « origine » que pour la souche « accoutumée ». Notons que le rendement pondéral sur acide lactique est nettement plus faible que celui que nous avons trouvé sur glucose ; ce rendement est environ de 298 mg de matière sèche par gramme de glucose consommé, ce qui est conforme aux résultats antérieurs d'autres auteurs (Tavlitzki, 1949 ; Lemoigne, Aubert, et Millet, 1955 ; Ephrussi, et *al.*, 1956).

Ces expériences ont été réalisées avant que ne soit connue l'existence de deux deshydrogénases stéréospécifiques pour les acides L et D-lactiques ; j'ai donc utilisé l'acide lactique pur Prolabo. Ces préparations commerciales contiennent environ 70 p. 100 d'acide L-lactique et 30 p. 100 d'acide D-lactique d'après Lachowiczt (communication personnelle). Cependant, il est permis de penser que la présence des deux formes L et D d'acide lactique dans les préparations ne peut modifier mes conclusions. En effet, nous verrons au cours du chapitre IV que le bilan de l'oxydation est identique pour les acides L et D-lactiques.

Apparemment, une légère augmentation du rendement de croissance se produit au cours de l' « accoutumance » ; cette augmentation n'a probablement pas de signification biologique. De toute manière, son importance est négligeable devant l'élévation des taux de croissance mis en évidence et décrits au paragraphe suivant.

C. — Étude de la vitesse de croissance

L'étude de la vitesse de croissance des souches « origines » et des souches « accoutumées » pendant 50 générations cellulaires a été réalisée sur le milieu de culture synthétique contenant 0,5 p. 100 d'acide lactique. Ces cultures sont effectuées à 28°, avec agitation, dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 10 ml de milieu. La densité optique de la culture est mesurée toutes les heures à l'aide d'un dispositif spécial (cf. première partie, § II, C) ; la description de ce dispositif a fait l'objet d'une publication antérieure (Galzy, 1958).

Pour les souches d' « origine », une préculture a été faite sur glucose ; cette préculture a été ensuite centrifugée et lavée deux fois à l'eau distillée stérile avant de servir

à l'ensemencement de la culture. Pour les souches « accoutumées », l'ensemencement du milieu est réalisé en prélevant une anse de la culture stock. Une préculture est généralement réalisée ainsi et sert à ensemencer la culture proprement dite.

Le développement d'une culture microbienne comporte trois phases de croissance :

— la phase de latence ;
— la phase exponentielle ;
— la phase stationnaire.

Les variations observées dans les temps de latence pour une même souche sur un milieu déterminé sont importantes. Le temps de latence varie avec l'importance de l'inoculum et avec les conditions de développement de la préculture pour une même souche. Il est difficile dans ces conditions d'interpréter les différences observées ; je n'étudierai pas dans cet exposé les résultats obtenus pour la phase de latence. La phase stationnaire correspond au développement maximum de la culture ; elle est étudiée au paragraphe précédent consacré au rendement de la croissance. Nous n'étudierons ici que la phase de croissance exponentielle.

TABLEAU I

Taux de croissance de la levure cultivée sur acide lactique

Souche de levure	59 R	276/3*d*	276/3*br*	1258/7*a*
Origine	0,10 0,07	0,23 0,22	0,16 0,14	0,14 0,15
« Accoutumée »	0,15 0,16	0,20 0,21	0,15 0,14	0,20 0,23

Le tableau donne les taux de croissance pour les diverses souches cultivées pour la première fois sur acide lactique (souche d' « origine ») et cultivées sur ce substrat depuis cinquante générations cellulaires (souche « accoutumée »). Dans chaque cas, les résultats de deux expériences sont donnés.

Pour chaque souche, la détermination du taux de croissance a été réalisée plusieurs fois ; je donne dans le tableau I les valeurs obtenues pour deux exemples dans chaque cas. Les taux de croissance sont exprimés en nombre de générations cellulaires par heure (h^{-1}). J'ai mesuré également les taux de croissance sur glucose pour les 4 souches d' « origine » ; les valeurs moyennes obtenues sont respectivement :

59 R	0,37 h^{-1}
276/3*d*	0,34 h^{-1}
276/3*br*	0,50 h^{-1}
1 258/7*a*	0,31 h^{-1}

Rappelons rapidement le mode de calcul du taux de croissance à partir des données expérimentales : l'équation de la droite de régression est calculée pour l'ensemble des déterminations effectuées dans la zone de croissance exponentielle. La pente de la droite correspond au taux de croissance. La précision de ces mesures est suffisamment bonne puisque la déviation standard est inférieure au 1/10 de la valeur

de la mesure. La comparaison des taux de croissance obtenus, deux à deux, a été effectuée systématiquement ; en utilisant la méthode de comparaison des moyennes de deux petits échantillons (VESSEREAU, 1948) j'ai pu vérifier si les différences observées entre les taux de croissance étaient significatives. Pour les calculs ci-dessus, j'ai porté en abscisse le temps exprimé en heures, et en ordonnée, le logarithme de base 2 du poids de matière sèche en mg/l.

Notons d'abord que les levures ont une croissance plus lente sur acide lactique que sur glucose. La souche 276/3*d* présente une vitesse de croissance sur acide lactique plus élevée que les trois autres souches ; cette souche présentait au contraire une

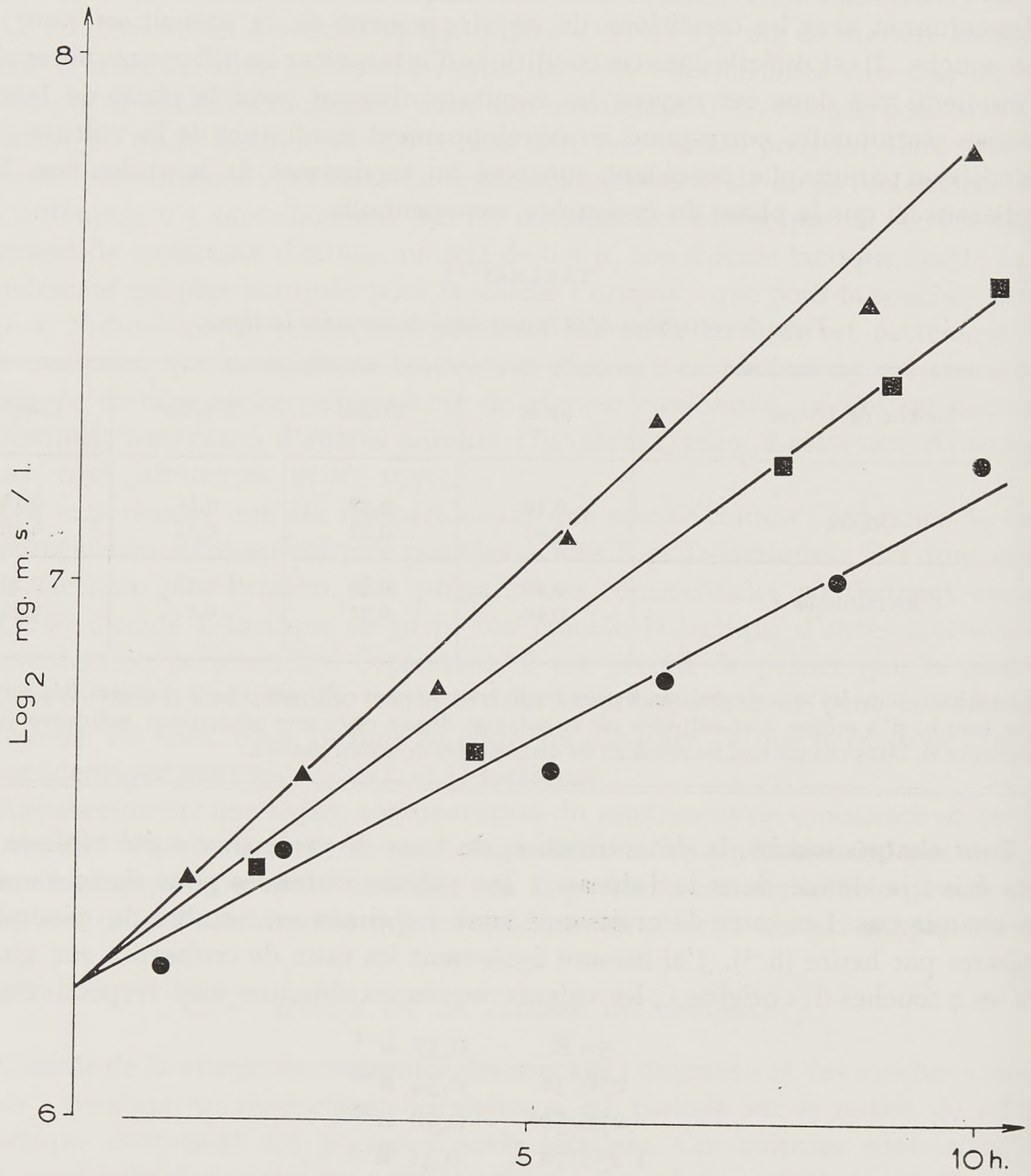


FIG. 2. — *Vitesse de croissance de la souche* 59 R, *sur acide lactique*
En abscisse : Temps, exprimé en heures.
En ordonnée : $\log_2$ du poids de matière sèche de la culture, exprimé en mg par litre.
Avec ce mode de représentation, l'accroissement d'une unité en ordonnée correspond au doublement du poids de la matière sèche dans la culture.
Cercles : souche 59 R cultivée pour la première fois sur acide lactique.
Carrés : après 25 générations cellulaires.
Triangles : après 50 générations cellulaires.

vitesse de croissance sur glucose plus faible que 276/3*br* et 59 R. Il semble donc qu'il n'y ait pas de relation directe entre les vitesses de croissance sur ces deux substrats pour une souche donnée ; une croissance relativement rapide sur glucose peut être accompagnée pour une souche donnée par une vitesse lente sur acide lactique et réciproquement.

La vitesse de croissance sur acide lactique des souches 276/3*d* et 276/3*br* n'a pratiquement pas été modifiée par la culture prolongée sur ce substrat.

Au contraire, 59 R présente une augmentation de la vitesse de l'ordre de 40 p. 100. Le taux de croissance de la souche d' « origine » est de 0,10 h^{-1} ; il est de 0,16 h^{-1} pour la souche « accoutumée » après 50 générations sur lactate ; il faut noter que la détermination du taux de croissance après 25 générations sur lactate a donné une valeur intermédiaire 0,12 h^{-1}. J'ai représenté les courbes de croissance obtenues pour la souche 59 R. cultivée pour la première fois sur acide lactique et après une culture prolongée (25 et 50 générations cellulaires) sur ce substrat (fig. 2).

De même, le taux de croissance de 1 258/7*a* passe de 0,15 h^{-1} pour la souche d' « origine » à 0,21 h^{-1} pour la souche « accoutumée ».

J'ai mis en évidence une « accoutumance » à la croissance sur acide lactique pour 2 souches de levure sur les 4 étudiées ; ce phénomène se traduit par une augmentation lente et progressive de la vitesse de croissance de ces souches au cours des cultures successives sur acide lactique. L'augmentation de la vitesse de croissance est assez lente et peut apparaître au premier abord bien faible puisque le taux de croissance n'a augmenté que de 40 p. 100 en cinquante générations cellulaires pour la souche 59 R. Mais il ne faut pas perdre de vue que la croissance est exponentielle ; une différence de taux de croissance apparemment faible suffit à conférer un grand avantage sélectif à une souche et peut jouer à ce titre un rôle biologique important.

III. — Variations physiologiques de la levure au cours des cultures successives sur acide lactique

L'étude comparée des souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » a été réalisée, les deux souches étant cultivées sur milieu synthétique ayant reçu comme seul substrat carboné soit du glucose soit de l'acide lactique. Diverses caractéristiques physiologiques ont été modifiées par la culture sur acide lactique.

A. — Métabolisme endogène et rendement

La respiration endogène de la levure « accoutumée » cultivée sur acide lactique est légèrement plus importante ($Q_{O_2} = 11$; $Q_{CO_2} = 10$) que celle de la souche d'origine cultivée sur glucose ($Q_{O_2} = 6$; $Q_{CO_2} = 6$) ou sur acide lactique ($Q_{O_2} = 6{,}5$; $Q_{CO_2} = 6{,}5$).

Le bilan de l'oxydation de l'acide lactique par les deux souches « origine » et « accoutumée » a été étudié en présence de quantités limitantes de substrat : les résultats sont identiques pour les 2 souches. Bien que le bilan des oxydations puisse varier d'une souche à l'autre je n'ai jamais observé que l' « accoutumance » à la croissance sur acide lactique d'une souche déterminée ait modifié ce bilan. Nous avons vu au paragraphe II-B que le rendement de la croissance sur acide

lactique n'était pas changé au cours des cultures successives sur acide lactique. Nous constatons maintenant que cette « accoutumance » ne modifie pas les proportions respectives d'acide lactique assimilé par la levure pour ses synthèses et oxydé en gaz carbonique et en eau. Il est normal que le rendement de croissance n'ait pas été modifié au cours des cultures successives sur acide lactique puisque l'assimilation de ce substrat n'a pas changé. Ces divers aspects du métabolisme seront étudiés en détail au chapitre IV.

B. — Respiration de l'acide lactique et du glucose

L'évolution de la vitesse de respiration pendant la croissance de chaque souche a été étudiée. La figure 3-A représente ces variations pour 59 R « origine » cultivée sur glucose. Le Q_{O_2} est de 140 au début de la croissance. La respiration baisse d'intensité ($Q_{O_2} = 30$) pendant la phase de croissance exponentielle (contre-effet Pasteur) puis atteint à nouveau sa valeur initiale pendant la dernière génération cellulaire. Ces variations avaient été précédemment décrites par Ephrussi et *al.* (1956). Leur signification a été discutée par Slonimski (1958). L'augmentation de l'activité respiratoire coïncide à la fois avec la disparition du glucose et la croissance de la levure sur l'alcool accumulé (Lemoigne, 1955) et avec la phase de ralentissement de la vitesse de croissance. La baisse de l'intensité respiratoire pendant la phase de croissance exponentielle peut être due à l'effet glucose mais, également, à l'extrême vitesse de la croissance.

La levure cultivée dans ces conditions présente durant toute sa croissance une respiration du glucose plus rapide que la respiration du lactate (tabl. n° 2). Les résultats donnés indiquent la vitesse de respiration des deux substrats pendant la première heure de mesure au Warburg. J'indique également le stade de la culture exprimé en mg de matière sèche par ml contenu dans la culture au moment du prélèvement.

En mesurant la valeur des Q_{O_2} au Warburg dans les conditions habituelles pendant un temps suffisamment long, j'ai constaté une lente augmentation des

TABLEAU 2

Vitesses de respiration de l'acide lactique et du glucose
Levure cultivée sur glucose

Stade de la culture exprimé en mg m.s/ml	0,55	0,71	0,75	0,81	1,54
Q_{O_2} acide lactique	50	69	79	90	81
Q_{O_2} glucose	90	108	127	128	138

Les vitesses de respiration du glucose et de l'acide lactique ont été déterminées sur une même suspension de levure dans chaque colonne. La première ligne indique le stade de la culture au moment du prélèvement de la levure ; la deuxième ligne donne la vitesse de la respiration de l'acide lactique et la troisième ligne la vitesse de respiration du glucose.

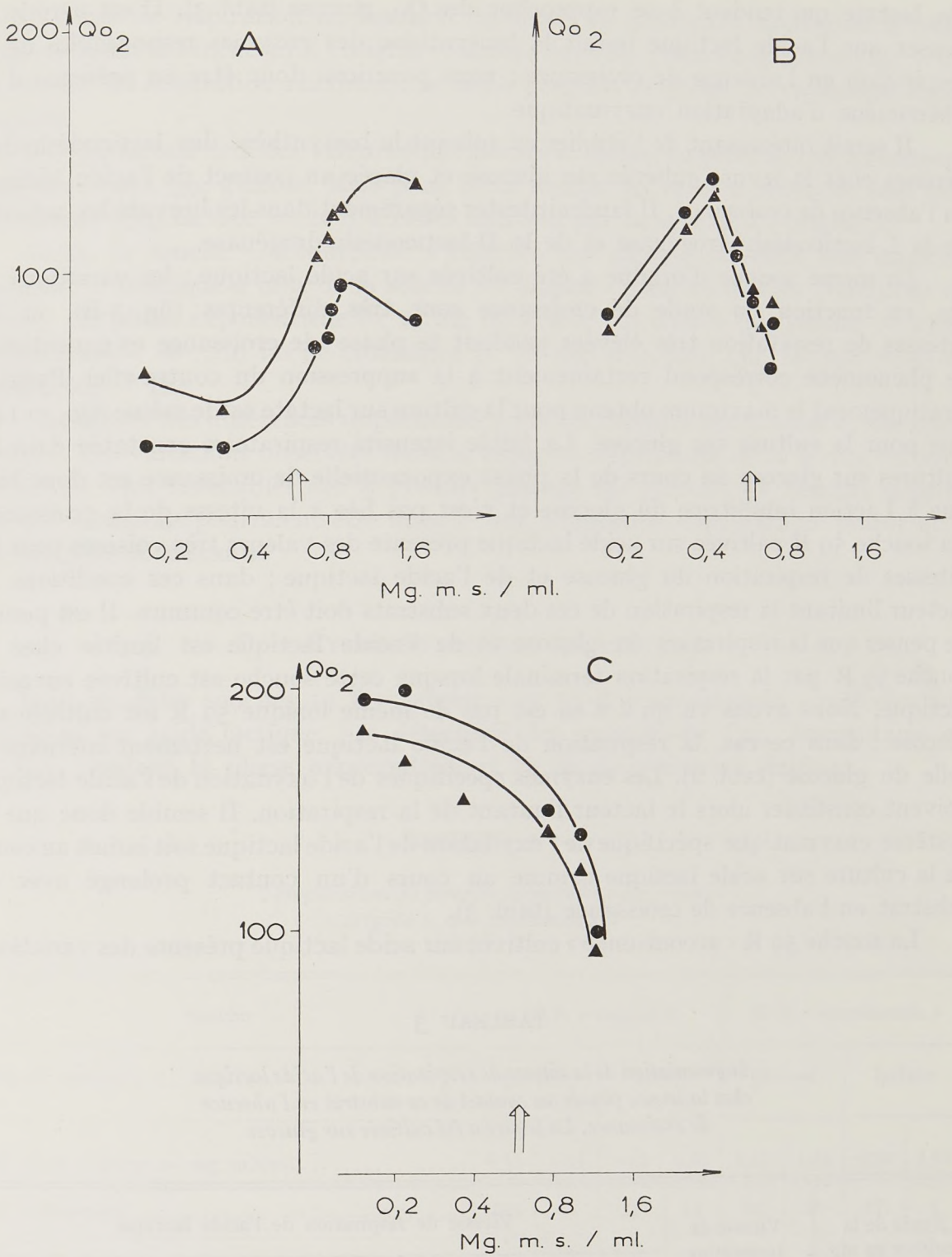


FIG. 3. — *Évolution du pouvoir respiratoire de la levure, mesuré sur glucose et sur acide lactique*

En abscisse : levure contenue dans 1 ml de culture, exprimé en mg de matière sèche.
En ordonnée : Qo_2.

Substrats : glucose : triangles.
acide lactique : cercles.

La flèche indique la fin de la phase de croissance exponentielle.

A — Souche 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » cultivées sur glucose.
B — Souche 59 R « origine » cultivée sur acide lactique.
C — Souche 59 R « accoutumée » cultivée sur acide lactique.

Q_{O_2} lactate qui tendent à se rapprocher des Q_{O_2} glucose (tabl. 3). Il est permis de penser que l'acide lactique induit la biosynthèse des enzymes responsables de sa respiration en l'absence de croissance ; nous pourrions donc être en présence d'un phénomène d'adaptation enzymatique.

Il serait intéressant de l'étudier en suivant la biosynthèse des lacticodéshydrogénases chez la levure cultivée sur glucose et placée au contact de l'acide lactique en l'absence de croissance. Il faudrait tester séparément dans les broyats les activités de la L-lacticodéshydrogénase et de la D-lacticodéshydrogénase.

La même souche d'origine a été cultivée sur acide lactique ; les variations de Q_{O_2} en fonction du stade de croissance sont très différentes (fig 3-B). et les vitesses de respiration très élevées pendant la phase de croissance exponentielle : ce phénomène correspond certainement à la suppression du contre-effet Pasteur. Pratiquement le maximum obtenu pour la culture sur lactate est le même ($Q_{O_2} = 140$) que pour la culture sur glucose. La faible intensité respiratoire constatée dans les cultures sur glucose au cours de la phase exponentielle de croissance est donc bien due à l'action inhibitrice du glucose et n'est pas liée à la vitesse de la croissance. La souche 59 R cultivée sur acide lactique présente des valeurs très voisines pour les vitesses de respiration du glucose et de l'acide lactique ; dans ces conditions, le facteur limitant la respiration de ces deux substrats doit être commun. Il est permis de penser que la respiration du glucose et de l'acide lactique est limitée chez la souche 59 R par la respiration terminale lorsque cette souche est cultivée sur acide lactique. Nous avons vu qu'il n'en est pas de même lorsque 59 R est cultivée sur glucose : dans ce cas, la respiration de l'acide lactique est nettement inférieure à celle du glucose (tabl. 2). Les enzymes spécifiques de l'oxydation de l'acide lactique doivent constituer alors le facteur limitant de la respiration. Il semble donc que le système enzymatique spécifique de l'oxydation de l'acide lactique soit induit au cours de la culture sur acide lactique comme au cours d'un contact prolongé avec ce substrat en l'absence de croissance (tabl. 3).

La souche 59 R « accoutumée » cultivée sur acide lactique présente des variations

TABLEAU 3

Augmentation de la vitesse de respiration de l'acide lactique chez la levure placée au contact de ce substrat en l'absence de croissance. La levure a été cultivée sur glucose

Stade de la culture en mg m.s./ml	Vitesse de respiration du glucose	Vitesse de respiration de l'acide lactique						
		0-1 h	1-2 h	2-3 h	3-4 h	4-5 h	5-6 h	6-7 h
0,75	—	93	106	97	109	114	116	126
0,75	127	58	71	73	81	91	82	101

Chaque ligne représente l'évolution d'heure en heure de la vitesse de respiration de l'acide lactique par une suspension de levure dans le tampon phosphate M/15 pH = 4,5.

de la vitesse de respiration en fonction du stade de croissance, analogues à celles observées pour la souche 59 R « origine » cultivée dans les mêmes conditions (fig. 3- C). La vitesse de respiration maximum se situe pendant la phase de croissance exponentielle.

Les Q_{O_2} lactate ont des valeurs équivalentes et même, en général, très légèrement supérieures aux Q_{O_2} glucose. Mais pour cette souche les valeurs obtenues sont très supérieures (Q_{O_2} lactate = 200) à celles données par la souche d'« origine ».

Enfin, la souche « accoutumée » cultivée sur glucose présente une capacité respiratoire identique à celle de la souche d'« origine » dans les mêmes conditions de culture. En phase exponentielle (0, 15 mg m. s./ml), j'ai trouvé Q_{O_2} lactate = 27 et Q_{O_2} glucose = 60 ; En fin de croissance (1, 31 mg m. s./ml), Q_{O_2} lactate = 55 et Q_{O_2} glucose = 111.

J'ai trouvé des différences importantes entre les cultures sur glucose et sur acide lactique. Les variations observées dans la capacité respiratoire de la levure cultivée sur lactate sont réversibles dès le premier passage sur glucose. Ce résultat suggère que ces variations pourraient être dues à une adaptation enzymatique plutôt qu'à une sélection de mutants.

C. — Étude du pouvoir fermentaire

Pour les deux souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » cultivées sur glucose et sur acide lactique, j'ai déterminé les valeurs du Q_{CO_2} fermentaire et du $Q^N_{CO_2}$ pendant la phase exponentielle et en fin de croissance (tabl. 4).

TABLEAU 4

Comparaison du pouvoir fermentaire des souches « origine » et « accoutumée »

Souche	59 R « origine »				59 R « accoutumée »			
Milieu de culture	glucose		lactate		glucose		lactate	
Stade de la culture en mg m.s/ml	0,55	1,54	0,13	0,65	0,15	1,31	0,20	1,07
Q_{CO_2} fermentaire	104	31	15	42	205	28	17	1
$Q^N_{CO_2}$	219	174	134	153	256	80	90	12

Le pouvoir fermentaire a été étudié pour les souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » cultivées soit sur glucose, soit sur acide lactique ; dans chaque cas, les valeurs du Q_{CO_2} fermentaire et du $Q^N_{CO_2}$ ont été déterminées pendant la phase de croissance exponentielle (première colonne) et au début de la phase stationnaire (deuxième colonne).

La levure cultivée sur glucose présente pendant la phase de croissance exponentielle une baisse de l'activité respiratoire et, simultanément, une élévation du Q_{CO_2}

fermentaire (Ephrussi, et *al.* 1956 ; Slonimski, 1958) ; j'ai obtenu un résultat semblable (tabl. 4) aussi bien avec la souche « accoutumée » qu'avec la souche « origine » dans les cultures sur glucose.

La souche d'« origine » cultivée sur lactate présente un pouvoir fermentaire aérobie plus faible que cultivée sur glucose. La différence est visible pendant la phase de croissance exponentielle. La levure 59 R « origine » cultivée sur acide lactique, qui présente un maximum d'activité respiratoire pendant la phase exponentielle de croissance, paraît avoir en même temps un Q_{CO_2} fermentaire minimum.

La souche « accoutumée » cultivée sur acide lactique a un pouvoir fermentaire anormalement faible ; la vitesse de respiration anaérobie devient inférieure à 100. Bien que ce phénomène n'ait pas été étudié en détail, il semble que la souche « accoutumée » présente un pouvoir fermentaire très nettement inférieur à celui de la souche d' « origine ». Il ne faut pas oublier cependant que la culture de cette souche sur glucose lui permet de récupérer, dès la première culture, le pouvoir fermentaire initial.

Cette perte importante du pouvoir fermentaire de la levure 59 R par culture prolongée en absence de glucose indique qu'une ou plusieurs enzymes de la glycolyse pourraient se comporter comme des enzymes adaptatives. Ce résultat est à rapprocher des observations de Slonimski (1953) qui a montré que la souche 59 R cultivée en anaérobiose perd en partie sa capacité fermentaire par incubation en l'absence d'oxygène dans le tampon phosphate M/15 : pH = 4,6 ; une souche à déficience respiratoire ayant proliféré en anaérobiose perd également une part importante de sa capacité fermentaire par incubation dans ce tampon aussi bien en l'absence d'air qu'en aérobiose. Cette baisse du pouvoir respiratoire semble liée dans les trois cas à l'absence de glucose exogène d'une part et à l'impossibilité d'utiliser les réserves endogènes d'autre part. Dans le cas que nous venons de décrire, le phénomène est très différent puisque la levure est cultivée constamment en aérobiose, que rien n'empêche en principe le métabolisme endogène de fonctionner et qu'une source d'énergie exogène existe. Cependant ces deux séries d'observations montrent que la capacité fermentaire d'une levure est susceptible de varier dans de fortes proportions.

IV. — Variations enzymatiques de la levure au cours des cultures successives sur acide lactique

J'ai déterminé diverses activités enzymatiques dans les broyats des deux souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » cultivées soit sur glucose soit sur acide lactique. Nous avons vu précédemment que les paramètres métaboliques de la levure varient au cours du cycle de croissance : les activités enzymatiques ont donc été déterminées pendant la phase exponentielle de croissance et en fin de croissance dans chaque cas. Le but recherché n'était pas de faire une étude systématique de l'activité de ces enzymes mais simplement d'effectuer des comparaisons entre souche « origine » et souche « accoutumée » d'une part, entre levure cultivée sur glucose et levure cultivée sur acide lactique d'autre part. Le tableau 5 présente donc seulement les valeurs relatives des activités enzymatiques obtenues en admettant que l'activité de la souche 59 R « origine » cultivée sur glucose est égale à l'unité pendant la phase de croissance exponentielle.

Il apparaît que les activités de la déshydrogénase du glucose 6 phosphate et de la déshydrogénase de l'isocitrate liée au TPN sont remarquablement stables. La biosynthèse de ces deux enzymes semble ne dépendre ni du milieu de culture, ni de la souche, ni de la phase de croissance. L'activité spécifique absolue de la glucose 6 phosphate déshydrogénase dans les broyats de 59 R est d'environ 0,20 (ΔE 340) rapportée à la minute et au mg de protéine. L'activité spécifique absolue de l'isocitrate déshydrogénase est dans les mêmes conditions de 0,10 (ΔE 340).

La biosynthèse des quatre autres enzymes étudiées est de façon générale inhibée pendant la croissance sur glucose, bien qu'à des degrés différents. Elles présentent en effet une augmentation d'activité pendant la phase stationnaire dans les cultures sur glucose. Il est probable que leur biosynthèse est inhibée par le glucose pendant la phase de croissance exponentielle. La dernière génération cellulaire s'effectue dans les cultures sur glucose, aux dépens de l'alcool accumulé (LEMOIGNE, AUBERT, et MILLET, 1955) ; l'augmentation d'activité de ces enzymes en fin de croissance doit être due à une dérépression liée à la disparition du glucose. Il est important de noter l'ampleur considérable de l'effet glucose. L'action inhibitrice du glucose ne s'exerce pas seulement sur les enzymes de la respiration terminale (SLONIMSKI, 1955) mais également sur les lacticodéshydrogénases, sur les enzymes du cycle de Krebs (fumarase, succinodéshydrogénase) et même sur l'alcool déshydrogénase qui est pourtant une enzyme du métabolisme fermentaire.

TABLEAU 5

Étude des activités enzymatiques dans les broyats de la souche 59 R

Milieu de culture	Glucose				Lactate			
Souches	« origine »		« accoutumée »		« origine »		« accoutumée »	
Stade de la culture en mg m.s/ml	0,55	1,54	0,15	1,31	0,13	0,65	0,20	1,07
Glucose 6 P déshydrogénase	1	1	1	1	1	1	1	1
Isocitrate déshydrogénase	1	2	1	1	2	1	2	1
Alcool déshydrogénase	1	5	2	3	—	15	16	12
Fumarase	1	7	1	5	8	14	13	18
Succino-déshydrogénase	1	2	1	2	2	5	7	3
Lactico-déshydrogénase	1	4	1	4	2	4	14	4

L'activité de chaque enzyme est rapportée à son activité chez la levure d'origine prélevée en phase exponentielle sur glucose, laquelle constitue ainsi un étalon de référence.

Les activités spécifiques absolues de la 1re colonne sont, dans l'ordre : 0,20 (ΔE_{340}) ; 0,10 (ΔE_{340}) ; 0,31 (ΔE_{340}) ; 0,06 (ΔE_{240}) ; 0,05 (ΔE_{550}) ; 0,07 (ΔE_{550}).

Elles sont toutes rapportées par minute et par milligramme de protéines.

Ces quatre enzymes : alcool déshydrogénase, fumarase, succinodéshydrogénase et lacticodéshydrogénase présentent des activités plus élevées dans les cultures sur acide lactique que dans les cultures sur glucose. Ces modifications d'activité sont dues probablement aussi à une dérépression provoquée par l'absence de glucose ; il n'est pas impossible qu'il y ait également une action inductrice de l'acide lactique sur les enzymes qui interviennent dans son métabolisme.

Nous venons de voir que la teneur en alcool déshydrogénase est plus forte dans les cultures sur acide lactique que dans les cultures sur glucose. Il semble même qu'elle soit plus élevée dans la culture sur lactate que pendant la croissance sur alcool qui doit se produire lorsque la culture sur glucose approche de la phase stationnaire. Cette observation semble paradoxale. Le rôle de l'alcool déshydrogénase dans le métabolisme du glucose et de l'alcool est connu ; il est par contre, difficile de concevoir le rôle que cette enzyme pourrait jouer dans le métabolisme de l'acide lactique. L'augmentation d'activité constatée est certainement liée à une dérépression plutôt qu'à une induction par le nouveau substrat. L'alcool déshydrogénase fonctionnant comme aldéhyde réductase, il est permis de penser que nous nous trouvons en présence de la répression de la biosynthèse de l'enzyme par le produit de son activité dans les cultures sur glucose et sur alcool comme dans certains cas décrits (Cohn, Cohen, et Monod, 1953).

D'autre part, une nouvelle alcool déshydrogénase a été découverte par Ebisuzaki et Guzman-Baron (1957). Il conviendrait de définir la part revenant à chacune des deux alcool déshydrogénases de la levure dans l'activité déshydrogénasique observée.

La succinodéshydrogénase et la fumarase présentent des activités plus élevées dans les cultures sur acide lactique que dans les cultures sur glucose ; la levée de l'effet glucose peut expliquer ce phénomène. Cependant ces deux enzymes interviennent probablement dans la respiration de l'acide lactique et une action inductrice de l'acide lactique ne peut être exclue à priori.

Cette remarque est plus vraie encore pour l'activité lacticodéshydrogénasique. Rappelons que cette activité a été mesurée en utilisant l'acide lactique du commerce Nous ne pouvons donc pas distinguer ainsi l'activité de la L-lactico-cytochrome *c* déshydrogénase de celle de la D-lactico-cytochrome *c* déshydrogénase. Cependant, dans les conditions d'expérience (cf. première partie, § IV), la D-lacticodéshydrogénase est fortement inhibée à cause de la force ionique ; les mesures effectuées correspondent donc essentiellement à l'activité L-lacticodéshydrogénasique.

Les souches 59 R « origine » et « accoutumée » ont des activités enzymatiques identiques dans les cultures sur glucose. Dans les cultures sur acide lactique, il semble que la souche « accoutumée » présente une teneur plus élevée en lactico-déshydrogénase.

En définitive, j'ai observé des variations importantes survenant lors de la première culture sur acide lactique ; au cours de l' « accoutumance » les variations se limitent à l'activité lacticodéshydrogénasique. Il est clair que cette étude devrait être faite de manière beaucoup plus détaillée en déterminant, non seulement les activités spécifiques en un temps donné, mais, également, les taux différentiels de synthèse des diverses enzymes en fonction des différentes souches, des différents milieux et des différentes phases de croissance. Avant d'entreprendre ce travail, il nous a paru préférable d'étudier le mécanisme génétique de l' « accoutumance ».

Rappelons qu'entre temps, M. Somlo (1962) a constaté que le taux de synthèse de la L-lactico-cytrochrome *c* réductase est plus élevée chez la souche 59 R « accoutumée » que chez la souche « origine » dans les cultures sur acide lactique.

V. — Discussion des résultats du chapitre I

Dès la première culture sur acide lactique, de nombreux changements peuvent être observés dans le métabolisme de la levure 59 R. Les vitesses de respiration du glucose et de l'acide lactique sont très voisines ; au contraire, la levure cultivée sur glucose présente une respiration bien moins active pour l'acide lactique que pour le glucose. Cette variation d'activité respiratoire s'accompagne d'une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes observée dans les broyats : fumarase, alcool déshydrogénase, succinodéshydrogénase et lacticodéshydrogénase.

Au cours de la croissance sur lactate, l'activité respiratoire maximum se situe pendant la phase de croissance exponentielle ; une croissance rapide n'est donc pas obligatoirement accompagnée par une biosynthèse ralentie du système respiratoire La faible activité respiratoire dans les cultures sur glucose en phase de croissance exponentielle n'est pas due à la vitesse de multiplication, mais résulte de l'inhibition causée par le substrat. Nous obtenons ainsi confirmation de l'« effet glucose ». Les augmentations d'activité de certaines enzymes observées chez la levure cultivée sur acide lactique peuvent s'expliquer en partie par la disparition de l'effet glucose et en partie par l'action inductrice du nouveau substrat. On peut remarquer en effet que ces enzymes présentent dans les cultures sur glucose une activité plus faible pendant la croissance exponentielle qu'en phase stationnaire, lorsque le glucose a pratiquement disparu. L'action inhibitrice du glucose est donc extrêmement vaste ; elle ne concerne pas seulement les enzymes de la respiration terminale mais également les lacticodéshydrogénases, l'alcool déshydrogénase et certaines enzymes intervenant dans le cycle de Krebs (fumarase ; succino-déshydrogénase). Une autre action particulière du glucose a pu être mise en évidence. Les enzymes de la glycolyse perdent leur activité au cours de la culture prolongée sur acide lactique.

Dès la première culture sur glucose, la levure retrouve son activité fermentaire. Le glucose pourrait jouer un rôle d'inducteur ou, au moins de protecteur, pour les enzymes de la glycolyse.

Les variations enzymatiques observées semblent liées à la dérépression provoquée par une culture prolongée en l'absence de glucose. Cependant j'ai constaté une augmentation de la vitesse de respiration du lactate qui tend à devenir identique à celle du glucose chez la levure non proliférante cultivée préalablement sur glucose et placée au contact de l'acide lactique. Il serait nécessaire de vérifier que les augmentations d'activité enzymatique dans les broyats observées au cours de la première culture sur acide lactique peuvent être également obtenues avec des cellules non proliférantes. Cependant, cette réserve faite, on peut penser qu'il y a eu induction par l'acide lactique de la biosynthèse des enzymes intervenant dans son oxydation.

Il est en définitive assez difficile de distinguer la part qui revient à l'absence d'effet glucose et celle qui est due à l'action inductrice de l'acide lactique dans les variations enzymatiques observées. Il est certain que les 2 phénomènes interfèrent. Il faudrait, pour déterminer la part qui revient à chacun d'eux dans les variations

physiologiques et enzymatiques observées, effectuer une étude plus approfondie. En particulier, il faudrait étudier le métabolisme de la levure sur d'autres substrats afin de séparer les effets dus à la suppression de l'effet glucose de ceux provoqués par l'action inductrice de l'acide lactique.

Il semble possible de faire quelques remarques sur le métabolisme de l'acide lactique. Rappelons que les L et D-lactico-cytrochrome *c* réductases transforment les acides correspondants en acide pyruvique. D'autre part, la levure possède une oxydase pyruvique qui permet la formation directe d'acétyl CoA. sans passer par l'acide acétique libre (ALVAREZ, VANDERWINKEL et WIAME, 1958). De plus, WANDERWINKEL a montré que les enzymes du shunt glyoxylique qui fonctionnent chez 59 R comme des enzymes adaptatives sont très actives dans le métabolisme de l'acide acétique. Nous pouvons donc penser que le métabolisme de l'acide lactique passe par le cycle de Krebs : acide lactique → acide pyruvique → acétyl CoA ; ce dernier rentre dans le cycle de Krebs en donnant avec l'acide oxaloacétique de l'acide cis-aconitique. L'augmentation d'activité de la fumarase et de la succino-cytochrome *c* réductase dans les cultures sur lactate pourrait être le témoin de ce rôle actif du cycle de Krebs. Par contre je n'ai pas constaté de variation d'activité des déshydrogénases de l'acide isocitrique ; cela pourrait traduire le rôle effacé de cette partie du cycle de Krebs dans le métabolisme du lactate et son « court-circuitage » par le shunt glyoxylique.

En définitive, les variations enzymatiques mises en évidence se sont surtout produites dès la 1re culture sur acide lactique ; elles sont liées à la suppression de l'effet glucose, et, peut-être en partie, à une action inductrice du nouveau substrat. Cette étude préliminaire nous a appris peu de choses sur le mécanisme physiologique et enzymatique de l'« accoutumance ».

Le résultat essentiel de ce chapitre reste la mise en évidence d'une « accoutumance » se traduisant par une augmentation lente de la vitesse de croissance de certaines levures au cours des cultures successives sur acide lactique.

J'ai pu effectuer au passage quelques observations importantes sur l'action inhibitrice du glucose. J'aurais pu essayer d'approfondir ces phénomènes. Il m'a paru plus sage d'étudier d'abord le mécanisme génétique de l'« accoutumance » (cf : chapitre II). L'étude génétique faite, il sera possible de revenir à l'étude physiologique et enzymatique.

Résumé du chapitre I

J'ai mis en évidence pour deux souches de levure un phénomène d'« accoutumance » au cours des cultures successives sur acide lactique. Cette « accoutumance » s'établit lentement et conduit à une vitesse de croissance sur acide lactique considérablement accrue.

CHAPITRE II

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE MUTATION ET DE SA SÉLECTION AU COURS DE LA CROISSANCE SUR ACIDE LACTIQUE

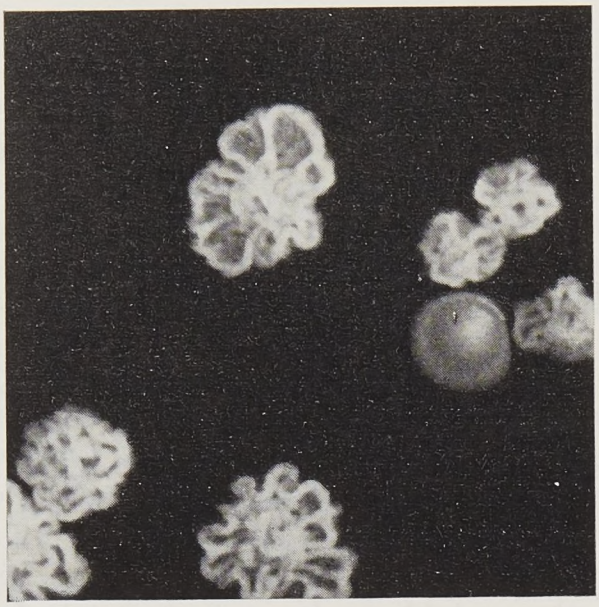
I. — Mise en évidence d'une mutation

L'étude de la croissance sur lactate des souches 59 R et 1258/7*a* a permis la mise en évidence d'une « accoutumance ». Ce phénomène a été progressif puisque la vitesse de croissance après 25 générations cellulaires présente des valeurs intermédiaires entre celles des souches « d'origine » et celles des souches « accoutumées ». Deux mécanismes peuvent *a priori* être responsables de cette « accoutumance » : une adaptation progressive à la croissance sur lactate de toute la population ou une sélection de mutants.

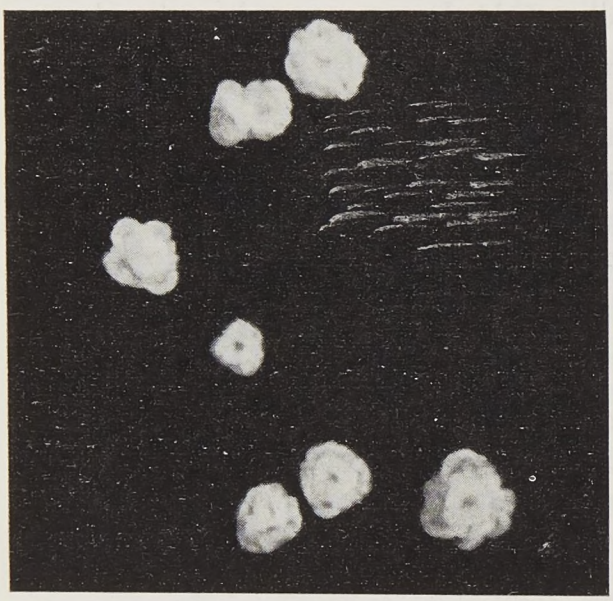
Dans le but de mettre en évidence des mutants éventuels, j'ai étalé les souches 59 R « origine » et 59 R « accoutumée » sur un milieu synthétique gélosé où l'acide lactique était la seule source de carbone (milieu GA). Un comptage hématimétrique des cultures permettait d'étaler un nombre identique de colonies dans toutes les boîtes de Pétri. Ce procédé a permis de vérifier tout d'abord que pratiquement toutes les cellules étaient capables de donner une colonie à la surface d'un milieu synthétique ne contenant que de l'acide lactique comme substrat carboné ; il était permis de craindre en effet qu'une partie seulement des cellules de la souche d'origine donne une croissance sur acide lactique. Dans les cultures sur milieu liquide, l'absence de croissance ou même la mort d'une partie de la population initiale aurait pu passer inaperçue. Les souches étudiées contiennent, comme toutes les levures de boulangerie, un pourcentage faible (de l'ordre de 1 p. 100) de « petites colonies » à déficience respiratoire. Ces levures à déficience respiratoire ne se multiplient pas et ne donnent pas de colonies sur acide lactique ; leur pourcentage est trop faible dans nos souches pour apparaître dans les comptages. D'autre part, ces étalements devaient permettre de voir si une hétérogénéité dans l'aspect des colonies était décelable dans les cultures sur acide lactique. Il était par exemple permis de penser que la souche 59 R « accoutumée » à croissance rapide sur lactate donnerait dans un temps déterminé des colonies plus grandes que 59 R « origine » ; éventuellement on pouvait espérer discerner ainsi la présence de mutants présentant une vitesse de croissance supérieure à l'ensemble de la population.

La taille des colonies de la souche 59 R étalée sur un milieu à base d'acide lactique a présenté une grande fluctuation. Compte tenu de cette hétérogénéité dans la taille des colonies, aucune différence n'est apparue entre les colonies des souches « origine » et « accoutumée » à aucun stade de leur développement. Des clonages ont été effectués en prélevant chez la souche « origine » et chez la souche « accoutumée » plusieurs colonies de grande taille et plusieurs colonies de petite taille ; chaque colonie prélevée individuellement a été étalée.

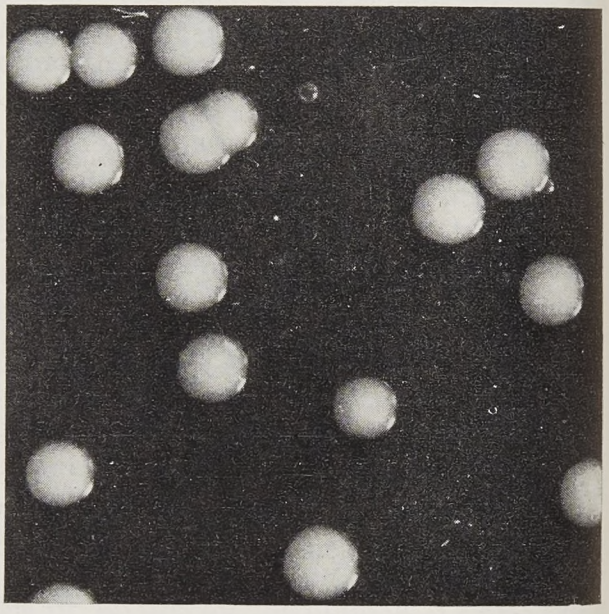
La taille des colonies sur acide lactique varie beaucoup pour un clone déterminé ; compte tenu de cette fluctuation, elle varie peu d'un clone à l'autre. La taille des colonies d'un clone ne dépend pas de la taille de la colonie qui lui a donné naissance. Par conséquent, les différences observées entre colonies de 59 R sont à imputer à la



Souche 59 R



Clone « plissé » de 59 R



Clone « lisse » de 59 R

PLANCHE I

Aspect des colonies de la souche 59 R.
Culture sur milieu gélosé à base d'acide lactique.

fluctuation phénotypique et non à la variation du patrimoine héréditaire ; ces différences ne sont pas stables en multiplication végétative.

Par contre, l'aspect des colonies présente des différences intéressantes. La souche 59 R « origine », cultivée sur lactate pendant 3 ou 4 générations cellulaires et étalée sur un milieu synthétique gélosé ne contenant que de l'acide lactique comme substrat carboné (milieu GA), conduit à des colonies fortement plissées, en forme de

« chou-fleur », de couleur blanc mat. Cependant, quelques colonies demeurent lisses, brillantes et de couleur crème ; ces colonies peuvent plisser très légèrement sur les bords au bout de 10 à 15 jours de culture mais présentent toujours un aspect différent des précédentes (planche 1). Alors que ce deuxième type de colonie est rare (1 à 3 p. 100) pour la souche 59 R « origine », il constitue au contraire la presque totalité de la population dans la souche 59 R « accoutumée ».

Cette différence de morphologie coloniale étant mise en évidence le problème se posait de savoir si ces caractéristiques étaient héréditairement stables en multiplication végétative. L'expérience-type consistait à prélever d'une part une colonie « lisse », d'autre part une colonie « plissée » ; chacun des 2 clones ainsi obtenus était multiplié en partie sur milieu glucosé et en partie sur milieu à base d'acide lactique. Il est ainsi possible de déterminer si la morphologie coloniale est une caractéristique phénotypique ou génotypique. En effet, si le caractère colonie lisse est phénotypique, la partie du clone lisse cultivée sur acide lactique continuera à donner des colonies lisses dans les étalements sur milieu gelosé à base d'acide lactique tandis que l'autre moitié du clone cultivée sur glucose donnera dans les mêmes conditions des colonies plissées. Si, au contraire, les deux cultures sur glucose et sur acide lactique du clone lisse donnent dans les étalements sur lactate des colonies lisses, la morphologie coloniale caractéristique des colonies lisses est bien héréditairement stable en multiplication végétative.

Cette première expérience a été réalisée sur une dizaine de clones lisses et de clones plissées. Dans tous les cas, la réponse a été claire. Les clones lisses donnent naissance à des colonies lisses, et les clones plissés à des colonies plissées dans les étalements sur acide lactique, quel que soit le milieu (G glucose ou G lactate) utilisé pour la multiplication du clone. Les types de morphologies coloniales mis en évidence sont donc héréditairement stables en multiplication végétative. Rappelons qu'il n'en est pas de même pour la taille des colonies ; les différences de taille observées entre les colonies d'une même souche ne sont pas stables en multiplication végétative.

Avant de terminer ce paragraphe, il convient de noter que ces différences de morphologie coloniale n'apparaissent pas lorsque les étalements sont effectués sur un milieu glucosé gélosé ; sur un tel milieu, toutes les souches décrites ici donnent des colonies lisses. Par contre, ces types coloniaux peuvent être mis en évidence sur divers milieux contenant d'autres substrats carbonés que l'acide lactique (acide acétique, éthanol). Dans la suite du travail, j'ai utilisé le plus souvent pour la mise en évidence du type colonial les milieux C et YGA dont j'ai donné précédemment la composition (première partie, § II).

II. — Comparaison des souches « origines » et « accoutumées »

La comparaison systématique des souches « origines » et « accoutumées » a été effectuée ; toutes les souches ont été étalées sur un milieu gélosé où l'acide lactique constituait la seule source de carbone.

La souche 1 258/7*a* présente comme 59 R deux types de colonies : colonies plissées, blanc mat(bien que moins fortement plissées que celle de 59 R) et colonies lisses, brillantes et crèmes. Le premier type domine dans la souche stock conservée sur glu-

cose ; le deuxième type au contraire domine dans la souche « accoutumée » au lactate.

Toutes les colonies de 276/3*br* sont lisses et brillantes ; il faut noter cependant que ces colonies prennent en vieillissant un aspect verruqueux et légèrement rosé, caractéristique des levures déficientes pour la synthèse de l'adénine. Aucune différence n'est décelable entre la souche « origine » et la souche « accoutumée ».

Enfin, la souche 276/3*d* « origine » présente des colonies fortement plissées ; aucune colonie lisse n'a pu être mise en évidence dans la souche « origine ». Par contre, quelques rares colonies lisses ont été trouvées dans les étalements de 276/3*d* « accoutumée ».

TABLEAU 6

Pourcentage de colonies lisses dans les cultures

Souches	59 R	276/3*d*	276/3*br*	1258/7*a*
Origine sur glucose	*3* (800)	*0* (65)	*100* (3406)	*0* (811)
Origine sur lactate	*3* (2072)	*0* (965)	*100* (578)	*1* (149)
« Accoutumée » sur lactate	*97* (1087)	*1* (478)	*100* (635)	*99* (2759)

Les valeurs indiquées dans ce tableau représentent le pourcentage de colonies lisses dénombré dans les étalements sur un milieu gélosé à base d'acide lactique ; le nombre de colonies comptées est indiqué entre parenthèses.

La première ligne donne les valeurs trouvées pour les souches « origines » stockées sur milieu gélosé yeast extract 0, 5 p. 100, glucose 0,5 p. 100 ; la deuxième ligne pour les mêmes souches après une culture de courte durée (5 à 7 générations cellulaires) sur milieu synthétique à base d'acide lactique ; enfin la troisième ligne donne les valeurs trouvées pour les souches « accoutumées » ayant subi au moins cinquante générations cellulaires sur milieu synthétique à base d'acide lactique.

Le tableau 6 donne les pourcentages de colonies lisses obtenus dans les étalements des diverses souches ; pour chacune d'entre elles, ont été étalées : la souche « origine » cultivée sur glucose ; la souche « origine » ayant subi une culture de courte durée sur milieu synthétique à base de lactate, la souche « accoutumée ».

Il est intéressant de noter que les souches qui ont donné une augmentation de leur vitesse de croissance sur acide lactique (59 R, 1 258/7*a*) sont celles qui présentent sur ce substrat une augmentation du pourcentage de colonies lisses après « accoutumance ». Il faut comparer à cet égard les résultats exprimés dans les tableaux 1 et 6.

La souche 276/3*br* « origine » donne des colonies lisses ; au cours des cultures successives sur lactate 276/3*br* ne présente ni modification de la morphologie coloniale ni augmentation de la vitesse de croissance sur acide lactique.

Enfin, la souche 276/3*d* « origine » est colonie plissée ; après culture prolongée sur lactate, il apparaît quelques colonies lisses mais elles sont restées très rares. Ce résultat doit être rapproché du fait que 276/3*d* ne présente pas de modification de la vitesse de croissance au cours des cultures successives sur lactate.

III. — Mise en évidence d'une sélection de mutants au cours des cultures successives sur acide lactique

Les résultats précédents suggèrent qu'un mutant, généralement préexistant dans les cultures sur glucose, envahit progressivement le milieu et est sélectionné au cours des cultures successives effectuées sur acide lactique. J'ai mis en évidence à plusieurs reprises cette sélection et je vais citer une expérience à titre d'exemple.

La souche 59 R « origine » est cultivée sur milieu synthétique à base d'acide lactique et étalée ensuite sur milieu gélosé à base de lactate (milieu GA). A partir de cet étalement, on isole deux colonies plissées et deux colonies lisses qui constituent respectivement les clones :

59 RP5 — 59 RP6 — 59 RL5 — 59 RL6

Chaque colonie est mise en suspension dans l'eau physiologique. Un contrôle effectué sur chacune de ces suspensions montre que les deux premiers clones donnent bien 100 p. 100 de colonies plissées et les deux autres 100 p. 100 de colonies lisses. J'obtiens ainsi 4 clones phénotypiquement homogènes.

A partir de chacune de ces suspensions un milieu synthétique liquide glucosé, et un milieu à base d'acide lactique sont ensemencés. J'ai effectué ainsi plusieurs cultures successives sur milieu glucosé et sur milieu à base d'acide lactique. J'ai fait des prélèvements à intervalles réguliers ; la culture est étalée sur milieu gélosé à base d'acide lactique ce qui permet de dénombrer le pourcentage de colonies lisses. Le tableau 7 indique les pourcentages de colonies lisses obtenus dans les étalements des cultures sur acide lactique et le tableau 8 les pourcentages obtenus pour les cultures sur glucose. Ces tableaux indiquent également le nombre de généra-

TABLEAU 7

Augmentation de la proportion de colonies lisses au cours des cultures successives sur lactate, de clones plissés à l'origine. Maintien dans les mêmes conditions de clones lisses à l'origine

Clones	Nombre de générations cellulaires					
	0	10	15	20	25	30
59 RP 5	0	4	36	97	91	95
59 RP 6	0	1	5	12	27	—
59 RL 5	100	100	100	100	100	100
59 RL 6	100	100	100	100	100	100

Les chiffres représentent le pourcentage de colonies lisses obtenu par étalement sur milieu gélosé à base d'acide lactique et par comptage d'environ 500 colonies. Les clones 59 RP 5 et 59 RP 6 proviennent chacun du prélèvement d'une seule colonie plissée. De même, les clones 59 RL 5 et 59 RL 6 proviennent chacun d'une seule colonie lisse.

rations cellulaires qui se sont produites entre l'isolement du clone et le moment de l'étalement ; le nombre indiqué correspond donc au nombre de générations effectuées sur le milieu de culture (à base de glucose ou à base d'acide lactique) utilisé dans l'expérience. Je n'ai pas tenu compte dans l'établissement de ces données, du nombre de générations cellulaires (20 environ) intervenu au cours de la formation de la colonie sur le milieu gélosé à base de lactate.

Il est important de noter que les clones lisses se maintiennent aussi bien dans les cultures sur glucose que dans les cultures sur acide lactique (tabl. 7 et 8). Dans les cultures sur glucose, le mutant apparaît généralement dans les clones plissés à l'origine ; cependant, il n'a pas été trouvé après 30 générations cellulaires sur glucose dans le clone 59 RP5 (tabl. 8).

La valeur d'équilibre sur glucose semble être atteinte très lentement. Pour la souche 59 R, cette valeur d'équilibre s'établit aux environs de 3 p. 100 (cf. tableau 6). Encore faut-il émettre des réserves sur cette valeur. En effet des mutants colonie lisse présentent un avantage sélectif dans les cultures sur éthanol (résultats non publiés). Nous savons d'autre part que la levure cultivée sur glucose

TABLEAU 8

Absence de sélection des mutations colonies lisses au cours des cultures successives sur milieu glucosé de clones plissés à l'origine. Maintien dans les mêmes conditions de clones lisses à l'origine

Clones	Nombre de générations					
	0	10	15	20	25	30
59 RP 5	0	0	0	0	0	0
59 RP 6	0	0	0	3	3	3
59 RL 5	100	100	100	100	100	100
59 RL 6	100	100	100	100	100	100

Les chiffres représentent le pourcentage de colonies lisses obtenu par étalement sur milieu gélosé à base d'acide lactique et par comptage d'environ 500 colonies. Les clones 59 RP 5 et 59 RP 6 proviennent chacun du prélèvement d'une seule colonie plissée. De même, les clones 59 RL 5 et 59 RL 6 proviennent chacun d'une seule colonie lisse.

effectue dans nos conditions d'expérience la dernière génération cellulaire de chaque culture aux dépens de l'éthanol accumulé. Au cours des cultures successives sur glucose, la levure subit en fait une série de cultures alternées sur glucose (4 à 6 générations cellulaires) et sur éthanol (1 génération cellulaire) ; l'avantage sélectif des mutants colonie lisse dans les cultures sur éthanol doit modifier la valeur d'équilibre. Il faudrait donc étudier la valeur d'équilibre de la mutation colonie lisse dans les cultures sur glucose en utilisant des doses de glucose extrêmement élevées afin d'éliminer la phase de croissance sur éthanol. Dans les clones plissés cultivés sur acide lactique (tabl. 7), le mutant colonie lisse élimine progressivement la souche plissée.

IV. — Discussion du chapitre II

J'ai mis en évidence une mutation, héréditairement stable en multiplication végétative, caractérisée par la morphologie coloniale sur des milieux gélosés à base d'acide lactique. Cette mutation envahit en totalité la population après une culture prolongée sur acide lactique. Elle peut être mise en évidence dans les cultures sur glucose mais demeure alors assez rare.

Les souches qui ont présenté une augmentation de la vitesse de croissance au cours des cultures successives sur acide lactique sont celles qui ont été envahies par les mutants colonies lisses. Les deux phénomènes sont nécessairement liés. Mais il faudrait encore déterminer exactement le rôle joué par l'acide lactique : simple sélection d'un mutant pré-existant ou induction de la mutation. Il semble possible de conclure que l'augmentation de la vitesse de croissance sur acide lactique au cours de l'« accoutumance » s'explique simplement par la sélection d'une mutation spontanée.

Les clones lisses présentent toujours un taux de croissance sur lactate beaucoup plus élevé que les clones plissés. Dans le cas de 59 R, rappelons que la population lisse a un taux de croissance de 0,16 h^{-1} alors que le taux de la population plissée est de 0,08 h^{-1}. Dans ces conditions, un calcul rapide indique qu'en 100 heures de croissance exponentielle, les lisses se multiplient environ 100 fois plus que les plissées ; dans ce même temps, l'ensemble de la population a effectué approximativement 9 générations cellulaires. Il est curieux de noter que la sélection est en fait beaucoup plus lente que ne le prévoit ce calcul. L'enrichissement réel observé en 10 générations cellulaires est très inférieur à un facteur 100 ; les résultats cités dans le tableau 7 mettent en évidence entre la 10e et la 20e génération cellulaire une multiplication par des facteurs de l'ordre de 24 pour 59 RP5 et 12 pour 59 RP6. Il est possible que les souches lisses, tout en ayant un grand avantage sélectif pendant la phase de croissance exponentielle sur acide lactique, présentent un certain désavantage sélectif au cours de la phase stationnaire ou de la phase de latence. Quoi qu'il en soit, il m'a paru inutile d'étudier davantage le rôle du lactate dans l'apparition de la mutation et dans la sélection du mutant. Il est manifeste que la vitesse de croissance élevée des mutants lisses suffit à expliquer leur sélection dans les cultures sur acide lactique.

Je vais donc analyser dans la suite du travail, les facteurs génétiques impliqués dans cette mutation, et étudier leurs mode d'action physiologique.

Résumé du chapitre II

Une mutation héréditairement stable en multiplication végétative modifie la morphologie coloniale et la vitesse de croissance sur les milieux à base d'acide lactique. Le phénomène d'« accoutumance » à la croissance sur acide lactique observé au chapitre précédent s'explique par la sélection de ces mutants colonies lisses au cours des cultures successives sur acide lactique.

CHAPITRE III

ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE LA MUTATION COLONIE LISSE

I. — Introduction

Au cours des travaux exposés au chapitre précédent, j'ai mis en évidence des mutants caractérisés par leur morphologie coloniale : colonie lisse ; ces mutants présentent en outre une croissance plus rapide sur acide lactique et ils sont de ce fait, sélectionnés au cours de cultures successives sur des milieux synthétiques où l'acide lactique constitue la seule source de carbone. Leur étude est facilitée considérablement par leur morphologie coloniale ; il est rare, en effet, qu'une modification physiologique importante (vitesse de croissance sur acide lactique) soit liée à une caractéristique morphologique facilement repérable. Il est d'autre part assez simple d'obtenir ces mutations puisqu'elles sont sélectionnées dans des conditions de culture bien définies. Je vais d'abord rechercher le déterminisme génétique de la mutation ; nous étudierons ensuite le mode d'action de ces mutations sur la physiologie de la levure en utilisant des souches de génotype bien défini.

La souche 59 R était pratique pour l'étude biochimique et physiologique de l'« accoutumance » car son métabolisme a été très étudié (Slonimski 1953). Mais cette souche ne possède pas de marqueurs génétiques autre que le signe ; j'ai donc préféré l'abandonner pour l'étude génétique de la mutation et utiliser des souches mieux adaptées pour ce genre de travail. En effet, les croisements de souche présentant des besoins en facteur de croissance différents sont très simples à obtenir ; il est possible de sélectionner les diploïdes prototrophes grâce au fait que les marqueurs auxotrophes se complémentent (Pomper, 1949 et 1951). L'étalement sur milieu minimum gélosé du mélange de copulation permet d'obtenir des colonies à partir des zygotes ou des cellules diploïdes alors que les cellules haploïdes des souches parentales ne donnent pas de croissance (cf. première partie, § V-A). Il existe une deuxième manière de réaliser des croisements (Shih-Yi-Chen, 1950) ; deux cellules issues chacune de deux clones de signes opposés sont placées côte à côte au bord d'une goutte de milieu liquide en chambre humide de Winge à l'aide du micromanipulateur de Fonbrune. La fusion des deux cellules peut être suivie au microscope et la culture diploïde obtenue à partir du zygote peut être prélevée au moment désiré. Cette technique permet de croiser des souches comme 59 R qui sont dépourvues de marqueur. J'ai préféré utiliser la technique de sélection des diploïdes par prototrophie qui est plus simple et qui permet d'obtenir par un simple étalement sur boîte de Pétri des milliers de colonies provenant d'un zygote différent.

Dans notre cas particulier, la sélection des diploïdes par prototrophie présente un avantage important : les deux souches auxotrophes à besoins complémentaires sont croisées et étalées sur milieu minimum ; si le substrat carboné de ce milieu est

l'acide lactique, le phénotype de tous les diploïdes obtenus est directement visible sur les boîtes. Chaque colonie provenant d'un seul zygote et toutes les colonies provenant de zygotes différents, il est possible de tester le phénotype d'un grand nombre de diploïdes simultanément. Il n'est pas sans intérêt de connaître le phénotype d'un grand nombre de diploïdes d'origine indépendante obtenus dans un même croisement au lieu de tester seulement un seul de ces diploïdes pris au hasard comme il est généralement pratiqué. Il est en effet souvent nécessaire de prélever une colonie diploïde avant de tester son phénotype pour le caractère étudié. Il est rare que le phénotype puisse être obtenu, comme c'est le cas ici, par simple lecture des boîtes, l'aspect des colonies sur milieu minimum à base d'acide lactique suffisant à donner le résultat.

Pour ces diverses raisons, j'ai utilisé deux souches présentant des besoins en facteurs de croissance différents et ayant un comportement génétique bien connu (Luzzati Clavilier et Slonimski, 1959-1960) (Clavilier 1962). Ces deux souches (4 021D3 et 6 153C9) proviennent du laboratoire du Pr Roman. Leurs génotypes, contrôlés par L. Clavilier et M. Luzzati sont les suivants :

4 021D3 a $ad_{3-6}ad_2hi_1tr_1me_1$
6 153C9 α $ad_{3-3}ad_6ur_1$

Ces souches sont complémentaires pour uracile méthionine et tryptophane ce qui rend leur croisement aisé. Aux mutations réverses près, la totalité de leur descendance est marquée par le besoin en adénine ce qui peut aider à détecter au cours du travail d'éventuelles contaminations.

(Dans un but de simplification, je désignerai la souche 4 021D3 par D, et la souche 6 153C9 par C, dans ce chapitre III).

Ces deux souches ont donné dans les étalements sur milieu à base d'acide lactique des colonies plissées. J'ai cherché à obtenir des mutants colonie lisse à partir de chacune d'entre elles. Elles ont été cultivées sur milieu synthétique à base d'acide lactique en effectuant des repiquages successifs. J'ai étalé la 2e culture sur milieu gélosé à base d'acide lactique (milieu C). Il est apparu environ 2 p. 100 de colonies lisses dans l'étalement de C et 6 p. 100 dans l'étalement de D. J'ai prélevé des colonies bien isolées dans chaque cas afin d'obtenir des subclones plissés ou lisses de chacune des deux souches. On obtient ainsi 4 subclones :

CL_1 colonie lisse
CP_1 colonie plissée
DL_1 colonie lisse
DP_1 colonie plissée.

La mutation colonie lisse peut donc se produire chez D et C ; elle est favorisée par la sélection naturelle au cours des cultures successives sur acide lactique (cf. chapitre II).

L'étude génétique de la mutation colonie lisse devient maintenant possible puisque nous possédons des clones lisses et plissés des deux souches complémentaires pour le signe et les facteurs de croissance. Avant de discuter les résultats observés, il faut voir si les souches utilisées sont normales et présentent des ségrégations régulières pour les marqueurs.

Notons tout d'abord que les marqueurs ont donné des ségrégations 2 : 2. J'ai

groupé les résultats des disjonctions obtenues dans les divers croisements impliquant les souches D et C ou les subclones qui en dérivent (tabl. 9).

TABLEAU 9

Ségrégation des marqueurs dans les croisements D × C
(a ad $_{3-6}$ ad_2 hi_1 tr_1 me_1) × (a ad_{3-3} ad_6 ur_1)

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
tr_1-signe	36	39	92	50	55
tr_1-ur_1	27	43	97	54	58
tr_1-me_1	22	20	125	49	74
me_1-ur_1	31	20	116	47	69
me_1-signe	24	34	109	52	65
ur_1-signe	28	29	110	50	66

La souche D ou les clones qui en dérivent ont été croisés avec C ou les clones qui en dérivent. Ce tableau donne la ségrégation des marqueurs pour l'ensemble de ces croisements : nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et pourcentage de tétratypes :

$$\frac{TT \times 100}{TT + DR + DP}$$

Ce tableau, indique pour tous les couples de caractères pris deux à deux, le nombre de ditypes parentaux, de ditypes recombinés et de tétratypes. Pour les loci signe et tr_1 par exemple, *les asques ditypes parentaux sont :*

$$tr_1 a\ ;\quad tr_1 a\ ;\quad TR_1 \alpha\ ;\quad TR_1 \alpha\ ;$$

les asques ditypes recombinés sont :

$$TR_1 a\ ;\quad TR_1 a\ ;\quad tr_1 \alpha\ ;\quad tr_1 \alpha\ ;$$

enfin les asques tétrapypes sont :

$$tr_1 a\ ;\quad TR_1 a\ ;\quad tr_1 \alpha\ ;\quad TR_1 \alpha.$$

Les pourcentages de recombinaison ont été calculés par la formule : pourcentage de recombinaison $= \dfrac{\text{(nombre de tétratypes)} + 2\ \text{(nombre de ditypes recombinés)}}{2\ \text{(nombre total de tétrades analysées)}} \times 100.$

L'erreur standard effectuée sur le pourcentage de recombinaison est donnée par la formule (L'HÉRITIER, P., communication personnelle) :

$$100\sqrt{\frac{1}{4N^3}\left[TN - T^2 + 4RN - 4R^2 - \sqrt{\frac{TR}{PN + TR}}\sqrt{4TR(N - T)(N - R)}\right]}$$

où N est le nombre total de tétrades analysées ;
T est le nombre de tétratypes ;
R est le nombre de ditypes recombinés ;
P est le nombre de ditypes parentaux.

J'ai analysé N = 167 tétrades. Les erreurs standards sur les pourcentages de recombinaison cités dans le tableau 9 montrent qu'aucun de ces pourcentages n'est significativement différent de 50 p. 100. Il n'y a donc pas de relation de linkage entre les marqueurs utilisés.

Cette conclusion est conforme aux observations précédemment faites (Carbondale Yeast Genetics Conference, 1961).

La disjonction de deux couples de gènes indépendants donne lieu à la formation de ditypes parentaux, de ditypes recombinés et de tétratypes dans les proportions 1 : 1 : 4 lorsque les deux loci sont éloignés du centromère. La liaison des deux gènes au centromère entraîne une baisse du pourcentage de post-réduction pour chacun d'eux ;or, les asques préréduits pour les deux couples de gènes sont nécessairement des ditypes .Il en résulte que la liaison au centromère des deux loci provoque une augmentation du pourcentage de ditypes et une baisse du pourcentage de tétratypes. Ce dernier pourcentage devient alors inférieur à 67 p. 100 (LINDEGREN, 1949).

Les différents couples de marqueurs étudiés ont donné des pourcentages de tétratypes voisins de 67 p. 100 (tabl. 9) à l'exception de 2 d'entre eux.

Le pourcentage de tétratypes est inférieur à 67 p. 100 pour le couple tr_1-ur_1 (tabl. 9) mais la différence entre le pourcentage théorique 67 p. 100 et le pourcentage expérimental 58 p.100 n'est pas significative. Par contre, le pourcentage expérimental trouvé pour le couple tr_1 α (55 p.100) est significativement inférieur à 67 p. 100 car l'erreur standard sur ce pourcentage est voisine de 4. Dans ces conditions, il est permis de penser que seuls tr_1 et signe sont liés au centromère. Ce résultat est conforme aux observations de HAWTHORNE et MORTIMER (1960). Cependant, il faut noter que HAWTHORNE et MORTIMER ont estimé les distances gène/centromère à 1 pour tr_1 et à 19 pour *a* ; ces distances permettent de prévoir un pourcentage de tétratypes d'environ 34 p. 100 en utilisant les abaques fournies par PRÉVOST (1963).

Le test χ^2 montre que les proportions que nous avons observées (22 p. 100 DP ; 23 p. 100 DR ; 55 p. 100 TT) sont significativement différentes de celles que l'on doit attendre (33 p. 100 DP ; 33 p. 100 DR ; 34 p. 100 TT) en fonction des distances au centromère trouvées par HAWTHORNE et MORTIMER pour tr_1 et α.

Dans l'ensemble, nos souches ont donc donné des résultats normaux pour la ségrégation des marqueurs ; les disjonctions obtenues correspondent à ce que l'on pouvait attendre en fonction des résultats antérieurs. Cependant, il semble que le signe *a* ait toujours donné un excès de tétratypes dans les disjonctions avec des gènes liés au centromère ; il semblerait que α/a se trouve dans ces souches à une distance du centromère nettement plus élevée que 19.

Il est connu que la distance du signe au centromère peut varier avec le groupe de

souches considéré. La ségrégation des marqueurs est donc normale dans nos souches. L'étude des mutants colonie lisse peut maintenant être présentée.

Au cours de l'analyse des tétrades, quelques rares asques aberrants pour la ségrégation d'un ou plusieurs marqueurs ont été éliminés de l'interprétation des résultats en considérant qu'ils avaient une chance non négligeable de provenir d'une erreur fortuite pendant la dissection.

II. — Étude des deux mutants CL_1 et DL_1

A. — Croisements parentaux

J'ai d'abord effectué les quatre croisements possibles (tabl. 10) entre les quatre souches étudiées :

— CL_1 phénotype lisse (L) α ad_{3-3} ad_6 ur_1 ;
— CP_1 phénotype plissé (PL) α ad_{3-3} ad_6 ur_1 ;
— DL_1 phénotype lisse (L) a ad_{3-6} ad_2 hi_1 tr_1 me_1 ;
— DP_1 phénotype plissé (PL) a ad_{3-6} ad_2 hi_1 tr_1 me_1 .

Les quatre diploïdes obtenus présentent un phénotype plissé.

TABLEAU 10

Croisements réciproques n° 1 à 4 : phénotype des diploïdes

	CL_1	CP_1
	α ad_{3-3} ad_6 ur_1	α ad_{3-3} ad_6 ur_1
DL_1 a ad_{3-6} ad_2 hi_1 tr_1 me_1	Diploïde n° 1 (PL)	Diploïde n° 3 (PL)
DP_1 a ad_{3-6} ad_2 hi_1 tr_1 me_1	Diploïde n° 2 (PL)	Diploïde n° 4 (PL)

Le génotype des souches parentes est indiqué à côté de chaque souche. Chaque case donne le numéro d'ordre du diploïde obtenu dans le croisement et son phénotype.

B. — Étude de la descendance du diploïde 1

L'extraction en masse des spores du diploïde 1 ($CL_1 \times DL_1$) a donné 294 colonies lisses et 96 colonies plissées ; nous avons donc les proportions 1 plissée : 3 lisses. Dans la suite de l'exposé je donnerai toujours les proportions de ségrégations dans l'ordre utilisé ici : plissée : lisse.

La dissection des asques a permis l'analyse de 32 tétrades dont les marqueurs ont ségrégés normalement en donnant chacun une ségrégation monogénique 2 : 2 ;

J'ai obtenu les résultats suivants :

— 4 asques ont donné une ségrégation 0 plissée : 4 lisses ;
— 26 asques ont donné une ségrégation 1 plissée : 3 lisses ;
— 2 asques ont donné une ségrégation 2 plissées : 2 lisses.

Le bilan général des 32 tétrades donne des proportions plissées : lisses voisines de 1 : 3, comme pour l'isolement des spores en masse. Il est permis de penser que l'on se trouve en présence de la ségrégation de 2 gènes indépendants. Nous appellerons le gène ayant muté dans la souche CL_1 : pl_1, et son allèle sauvage PL_1. La mutation intervenue dans DL_1 toucherait un locus différent dont nous appellerons les allèles pl_2 et PL_2. Le caractère colonie lisse serait provoqué par la présence dans une souche haploïde soit du gène pl_1, soit du gène pl_2. Dans les souches diploïdes hétérozygotes, les gènes sauvages PL_1 et PL_2 seraient dominants sur les gènes mutés pl_1 et pl_2. Ces hypothèses expliqueraient d'une part le phénotype plissé du diploïde 1 et d'autre part les ségrégations obtenues dans l'analyse des tétrades.

En se basant sur ces données, on peut considérer les asques qui donnent une ségrégation 1 plissée : 3 lisses, comme étant des tétratypes ($PL_1\,PL_2\,pl_1$; pl_2 ; $pl_1\,PL_2$; PL_1pl_2) ; les asques dont la ségrégation est 0 plissée : 4 lisses correspondraient aux ditypes parentaux (pl_1PL_2 ; pl_1PL_2 ; PL_1pl_2 ;PL_1pl_2) ; enfin les asques dont la ségrégation est 2 plissées : 2 lisses correspondraient aux ditypes recombinés (pl_1pl_2 ; pl_1pl_2 ; PL_1PL_2 ; PL_1PL_2). Nous verrons par la suite que cette hypothèse est confirmée par l'analyse des tétrades des diploïdes 2 et 3.

A titre de contrôle, j'ai fait une série de croisements avec les 4 souches issues de l'asque 2 du diploïde n° 1. Cet asque avait donné une ségrégation 2 plissées : 2 lisses (doubles recombinants). Les quatre spores ont donc les génotypes suivants :

1/2*a* phénotype plissé *a* $PL_1PL_2UR_1me_1TR_1$
1/2*d* phénotype plissé α $PL_1PL_2ur_1ME_1TR_1$
1/2*b* phénotype lisse *a* $pl_1pl_2ur_1ME_1tr_1$
1/2*c* phénotype lisse α $pl_1pl_2UR_1me_1tr_1$

Afin de vérifier les génotypes de ces quatre souches, j'ai effectué les deux croisements suivants :

1/2*a* × 1/2*d* (croisement n° 5)
1/2b × 1/2c (croisement n° 6)

Le diploïde 5 est plissé. L'extraction des spores en masse a donné 343 colonies plissées. Le diploïde 6 est lisse ; sa descendance a été testée par extraction des spores en masse et a fourni ainsi : 2 841 colonies lisses.

En outre, j'ai effectué les 4 croisements en retour correspondant aux souches plissées 1/2*a* et 1/2*d* :

CP_1 × 1/2*a* (croisement 7) ;
CL_1 × 1/2*a* (croisement 8) ;
DP_1 × 1/2*d* (croisement 9) ;
DL_1 × 1/2*d* (croisement 10).

Les 4 diploïdes obtenus (7, 8, 9, et 10) sont plissés. J'ai étudié la descendance de ces divers diploïdes.

L'analyse des tétrades du diploïde 7, ($CP_1 \times 1/2a$) a mis en évidence une ségrégation 4 plissées : 0 lisse pour les 29 asques étudiés. Ce résultat est conforme à l'hypothèse suivant laquelle aucun gène muté colonie lisse ne figurait dans les 2 souches croisées ; il est confirmé par une extraction des spores en masse qui donne 5 091 colonies plissées.

Au cours de l'étude du diploïde 8, ($CL_1 \times 1/2a$), 18 asques ont été disséqués et ont donné une ségrégation normale des marqueurs. Tous ces asques ont donné une ségrégation : 2 plissées : 2 lisses.

Ce résultat indique qu'il n'y a eu intervention que d'un seul couple de gènes ; pl_1PL_1, le gène muté pl_1 étant apporté par CL_1.

Je donne dans le tableau 11 les résultats de ces ségrégations en indiquant pour tous les gènes étudiés pris deux à deux le nombre de ditypes parentaux, de ditypes recombinés et de tétratypes. Les pourcentages de recombinaisons et de tétratypes sont également donnés. Ces divers résultats seront discutés plus loin.

TABLEAU II

Étude de la descendance du diploïde n° 8 : $CL_1 \times 1/2a$
($\alpha pl_1PL_2ad_{3\text{-}3}ad_6ur_1$) × ($aPL_1PL_2me_1$)

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_1-signe	2	3	12	53	70
pl_1-me_1	1	4	12	58	70
pl_1-ur_1	0	1	16	53	94

Résultats de l'analyse des tétrades.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{TT \times 100}{TT + DR + DP}$$

Le diploïde 9, ($DP_1 \times 1/2d$) a donné 6 798 spores plissées, par extraction en masse des spores. La mortalité est très élevée dans la descendance de cette souche : un faible pourcentage des spores prélevées donne une germination. Je n'ai obtenu que 5 asques ayant donné 4 spores viables. Tous les cinq présentent une ségrégation 4 plissées : 0 lisse.

Le diploïde 10 ($DL_1 \times 1/2d$) est également caractérisé par une faible germina-

tion des spores. Les 5 asques étudiés qui ont donné 4 spores viables et une ségrégation normale des marqueurs présentent une ségrégation : 2 plissées : 2 lisses. Cette ségrégation monogénique est conforme à notre hypothèse ; le gène muté pl_2 est apporté par la souche DL_1, et son allèle sauvage PL_2 par la souche-fille 1/2*d*. Les résultats obtenus pour la ségrégation du couple pl_2/PL_2 avec les marqueurs sont indiqués dans le tableau 12. J'ai ici un nombre trop réduit d'asques pour calculer les pourcentages de recombinaison et de tétratypes. Ces résultats seront discutés ultérieurement.

TABLEAU 12

Étude de la descendance du diploïde n°10 : $DL_1 \times 1/2d$
($aPL_1pl_2ad_3$-$_6ad_2hi_1tr_1me_1$) × ($\alpha PL_1PL_2ur_1$)

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes
pl_2-tr_1	4	1	0
pl_2-signe	2	0	3
pl_2-me_1	1	1	3
pl_2-ur_1	0	2	3

Résultats de l'analyse des tétrades. Le nombre d'asques analysé étant très faible, les pourcentages de recombinaison et de tétratype n'ont pas été calculés.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT).

C. — Étude du diploïde 2

L'extraction en masse des asques du diploïde 2 ($CL_1 \times DP_1$) a donné 741 colonies plissées et 773 colonies lisses ; donc des proportions 2 : 2.

La dissection de 19 asques ayant une ségrégation normale des marqueurs donne les résultats suivants :

— 18 asques présentent une ségrégation 2 plissées : 2 lisses.

— 1 asque présente une ségrégation 3 plissées : 1 lisse.

Ce résultat est conforme à l'hypothèse précédemment émise. Nous aurions ici la ségrégation d'un seul couple de gènes PL_1 pl_1 ce qui est conforme aux proportions 2 : 2. L'asque n° 18 a donné une proportion anormale 1 : 3 ; de semblables anomalies de la ségrégation se retrouvent toujours avec une fréquence de 1 à 2 p. 100 chez la levure (Hawthorne, et Mortimer, 1960).

J'ai donné dans le tableau 13 la répartition des 18 tétrades régulières en ditypes parentaux, ditypes recombinés et tétratypes pour tous les caractères étudiés pris deux à deux. Ces résultats ont permis de calculer les pourcentages de recombinaison ainsi que les pourcentages de tétratypes. Les pourcentages de recombinaison entre le locus pl_1 et les différents gènes utilisés comme marqueurs sont tous voisins de 50 p. 100, Il est donc possible d'admettre que le locus pl_1 n'est lié à aucun des marqueurs.

Une liaison éventuelle du gène, avec le centromère pourrait être mise en évidence en étudiant la disjonction de ce gène avec le gène tr_1 comme nous l'avons vu au paragraphe précédent. HAWTHORNE (1955) a montré que le gène tr_1 est situé à une unité du centromère du 4e chromosome ; il ségrège donc en donnant une fréquence de post-réduction égale au double de sa distance au centromère c'est-à-dire 2 p. 100. La ségrégation indépendante de deux couples de gènes éloignés du centromère donne une proportion de ditypes parentaux, de ditypes recombinés et de tétratypes égale à 1 : 1 : 4. La liaison au centromère des deux gènes étudiés aboutit à l'obtention d'une proportion

TABLEAU 13

Étude de la descendance du diploïde n° 2 : $CL_1 \times DP_1$

$(\alpha pl_1 ad_3\text{-}_3 ad_6 ur_1) \times (a\mathrm{PL}_1 ad_3\text{-}_6 ad_2 hi_1 tr_1 me_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_1-tr_1	2	1	15	47	83
pl_1-signe	2	1	15	47	83
pl_1-me_1	4	4	10	50	55
pl_1-ur_1	6	4	8	44	44

Résultats de l'analyse des tétrades.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\,DR) \times 100}{2(TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

anormalement élevée de ditypes parentaux et recombinés ; les pourcentages de post-réduction des deux gènes sont en effet très faibles par suite de la liaison au centromère, et les asques préréduits pour les deux couples de gènes sont nécessairement des ditypes. Un pourcentage de tétratypes nettement inférieur à 67 p.100 constitue donc une présomption de liaison au centromère pour les deux loci étudiés. Nous venons de voir d'autre part que les deux couples de gènes $TR_1 tr_1$ et $PL_1 pl_1$ donnent une ségrégation indépendante. L'apparition d'une tétrade tétratype (PL_1TR_1 ; $PL_1 tr_1$; pl_1TR_1 ; $pl_1 tr_1$) correspond à une post-réduction pour au moins l'un des deux couples de gènes étudiés ; la post-réduction de tr_1 est peu fréquente (2 p. 100) et par conséquent aussi la post-réduction simultanée des deux couples $PL_1 pl_1$ et $TR_1 tr_1$. Il est possible de considérer en première approximation que l'apparition d'une tétrade tétratype est une preuve de la post-réduction de $PL_1 pl_1$. Les tétrades ditypes parentales (pl_1TR_1 ; pl_1TR_1 ; $PL_1 tr_1$;

PL_1tr_1) ou ditypes recombinés (pl_1tr_1 ; pl_1tr_1 ; PL_1TR_1 ; PL_1TR_1)pourraient correspondre à une préréduction pour les deux couples de gènes allèles TR_1tr_1 et PL_1pl_1 ou au contraire à une post-réduction des deux couples de gènes considérés. Dans l'exemple étudié, l'un des deux loci tr_1 est connu pour être très proche du centromère ; il est donc possible de négliger l'éventualité d'une double post-réduction et de considérer qu'une post-réduction de PL_1pl_1 entraîne la formation d'une tétrade tétratype. Ainsi, la distance du gène au centromère serait égale, très approximativement à la moitié du pourcentage de tétratypes dans le cas étudié si le gène *p*l était lié au centromère.

Une méthode de calcul rigoureuse de la distance d'un gène au centromère dans les tétrades non ordonnées est fournie par Prévost (1963). Un abaque permet de déterminer la distance d'un gène au centromère lorsque sont connus le pourcentage de tétratypes donnés par ce gène avec un gène marqueur lié au centromère et la distance de ce même gène marqueur au centromère (Prévost 1963). J'ai utilisé cet abaque chaque fois qu'une liaison gène-centromère a pu être mise en évidence. Les résultats fournis dans le tableau 13 montrent que pl_1 n'est pas lié au centromère puisque le pourcentage de tétratypes pour les couples pl_1PL_1 et tr_1TR_1 est supérieur à 67 p. 100.

J'ai effectué de nombreux croisements en retour colonie lisse × colonie lisse. Chaque fois que cela a été possible j'ai croisé avec le parent colonie lisse les deux souches lisses issues d'un même asque. Tous les diploïdes obtenus ont présenté un phénotype lisse ce qui confirme bien le caractère monogénique de la ségrégation observée dans la descendance du diploïde 2. J'ai étudié plus particulièrement le diploïde n° 75 issu du croisement de CL_1 (souche mère « colonie lisse » du diploïde 2) par 2/25*d* (souche-fille colonie lisse provenant du diploïde 2). Ces deux souches avaient pour génotypes :

$$CL_1 \quad \alpha pl_1PL_2ad_3{-}_3ad_6ur_1$$
$$2/25d \quad apl_1PL_2tr_1.$$

La souche fille 2/25*d* n'avait pas été testée pour les marqueurs adénine et histidine. Sauf indication spéciale, je n'ai pas testé les souches obtenues dans l'analyse des tétrades pour les marqueurs ad_{3-3} ; ad_{3-6} ; ad_2 ; ad_6 ; et hi_1.

16 asques de cette souche ont présenté une ségrégation normale pour les marqueurs. Tous ont donné le même résultat : 4 spores lisses.

D. — Étude du diploïde 3

L'extraction en masse des spores du diploïde 3 (CP_1 × DL_1) a donné 532 colonies plissées et 467 colonies lisses. Ce résultat est voisin des proportions 2 : 2. J'ai disséqué 21 asques qui ont donné des ségrégations normales pour les marqueurs. On constate que 20 d'entre eux donnent une ségrégation 2 : 2. Un asque donne une ségrégation inattendue : l'asque 39 qui donne 4 plissées et 0 lisse. Ces résultats sont conformes à l'hypothèse puisque nous avons ici la ségrégation d'un seul couple de gène (PL_2 et pl_2).

Le tableau 14 indique les ségrégations obtenues pour les divers marqueurs et pour le gène pl_2. Il apparait que le gène pl_2 est fortement lié au centromère d'après

la ségrégation des deux gènes pl_2 et tr_1 : on n'obtient en effet que 2 tétratypes sur 20 asques étudiés. La ségrégation du signe confirme ce résultat : on obtient pour les gènes pl_2 et signe, 9 ditypes pour 11 tétratypes. Les pourcentages de recombinaison de pl_2 avec les divers marqueurs sont assez voisins de 50 p.100 et il ne semble pas que ce gène soit lié nettement avec aucun des marqueurs.

TABLEAU 14

Étude de la descendance du diploïde n° 3 : $CP_1 \times DL_1$
($\alpha PL_1PL_2ad_3\text{-}_3ad_6ur_1$) ($aPL_1pl_2ad_3\text{-}_6ad_2hi_1tr_1me_1$)

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_2-tr_1	8	10	2	55	10
pl_2-signe	6	3	11	42	55
pl_2-me_1	3	2	15	47	75
pl_2-ur_1	1	6	13	62	65

Résultats de l'analyse des tétrades.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (D P.), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

Tous les croisements en retour effectués colonie lisse × colonie lisse ont donné des diploïdes de phénotype lisse. L'un d'entre eux a été particulièrement étudié : le diploïde 149 issu du croisement de DL_1 par 3/18*a*. La souche DL_1 ($aPL_1pl_2ad_3\text{-}_6hi_1tr_1me_1$) est la souche mère colonie lisse du diploïde 3 tandis que la souche 3/18*a*($\alpha\ PL_1pl_2ur_1$) est une souche fille colonie lisse provenant du diploïde 3.

Les dix asques disséqués de ce diploïde 149 ont été normaux pour la ségrégation des marqueurs et ont tous donné 4 souches lisses. Les résultats de ces divers back cross confirment bien que la ségrégation observée dans la descendance du diploïde n° 3 était monogénique.

E. — Étude du diploïde 4

L'extraction en masse du diploïde 4 ($CP_1 \times DP_1$) a donné 2 119 colonies plissées et 16 colonies lisses ; c'est-à-dire environ 0,75 p. 100 de colonies lisses.

La dissection de 8 asques a été effectuée. Les huit asques ont donné 4 spores plissées. Il semble donc bien que les souches plissées CP_1 et DP_1 ne portent pas de facteurs capables de déterminer l'apparition du phénotype colonie lisse dans leur descendance. Cependant, la proportion de colonies lisses trouvées dans l'isolement en masse des spores est anormalement élevée. Nous avons vu au chapitre précédent

que les souches haploïdes conservées sur glucose pendant plusieurs repiquages présentaient 2 à 3 p. 100 de colonies lisses dans les étalements sur acide lactique; mais dans ce cas il était permis de penser que la présence de ces colonies lisses était favorisée par une sélection au cours de la phase de croissance sur éthanol qui se produit en fin de croissance. Au contraire, dans le cas présent, la sélection est sinon impossible du moins peu probable puisque les souches sont diploïdes et que le caractère lisse est récessif.

L'apparition de ces colonies lisses pourrait correspondre à la mutagenèse spontanée et au stockage dans le diploïde des gènes mutés récessifs. La souche 4 a subi peu de repiquages (2 ou 3 au plus) au moment de cette extraction de spores ; il paraît peu probable que la mutagenèse ait pu aboutir à l'accumulation d'un aussi grand nombre de facteurs récessifs *pl* en l'absence de sélection. Quoiqu'il en soit, l'origine de ces colonies lisses mériterait d'être éclaircie mais leur présence ne peut modifier les conclusions précédemment formulées.

F. — Discussion

Je viens de décrire en détail l'analyse de la descendance des diploïdes obtenus par les croisements réciproques prévus dans le tableau 10. Ces résultats sont résumés dans le tableau 15. Les souches sauvages plissées croisées entre elles donnent une

TABLEAU 15

Ségrégation des croisements réciproques :

$CP_1 \alpha PL_1PL_2\ ad_3\text{-}_3ad_6ur_1$
$CL_1 \alpha pl_1PL_2\ ad_3\text{-}_3ad_6ur_1$
$DP_1\ a\ PL_1PL_2\ ad_3\text{-}_6ad_2hi_1tr_1me_1$
$DL_1\ a\ PL_1pl_2\ ad_3\text{-}_6ad_2hi_1tr_1me_1$

	CP_1 PL_1PL_2		CL_1 pl_1PL_2	
DP_1	< 1		51	
PL_1PL_2	4 : 0	8	4 : 0	0
	3 : 1	0	3 : 1	1
	2 : 2	0	2 : 2	18
	1 : 3	0	1 : 3	0
	0 : 4	0	0 : 4	0
DL_1	47		75	
PL_1pl_2	4 : 0	1	4 : 0	0
	3 : 1	0	3 : 1	0
	2 : 2	20	2 : 2	2
	1 : 3	0	1 : 3	26
	0 : 4	0	0 : 4	4

Dans chaque case, le premier chiffre indique le pourcentage de spores lisses trouvé par extraction en masse. Les chiffres suivants donnent les résultats de l'analyse des tétrades dans l'ordre habituel (plissé : lisse) : nombre d'asques de chaque catégorie dénombrés.

descendance entièrement plissée. Le croisement d'une souche mutante colonie lisse par une souche sauvage plissée donne un diploïde plissé ; la ségrégation obtenue dans l'analyse des tétrades est monogénique. Le phénotype colonie lisse est donc déterminé par la mutation d'un seul gène ; le gène muté est récessif devant son allèle sauvage. Le croisement de deux mutants étudiés $CL_1 \times DL_1$ a donné un diploïde N° 1 plissé ; les deux mutations se complémentent donc dans le diploïde et n'appartiennent pas à la même unité de fonction. L'analyse de la descendance de ce croisement montre par ailleurs que les deux gènes mutés respectivement dans CL_1 et DL_1 ne sont pas liés. La ségrégation de ces deux gènes par rapport aux marqueurs a été étudiée et le tableau 16

TABLEAU 16

Tableau récapitulatif des croisements impliquant pl_1 et pl_2

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_1-tr_1	2	1	15	47	83
pl_1-signe	4	4	27	50	77
pl_2-tr_1	12	11	2	48	8
pl_2-signe	8	3	14	40	56

Résultats de l'analyse des tétrades. Ce tableau groupe les résultats des tableaux 11, 13 pour pl_1 ; des tableaux 12 et 14 pour pl_2.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

donne l'ensemble des résultats obtenus dans les divers croisements impliquant pl_1 et pl_2. Le locus de pl_1 est situé loin du centromère puisque les pourcentages de tétratypes observés pour les couples pl_1-tr_1 d'une part, et pl_1-signe, d'autre part sont supérieurs à 67 p. 100. Par contre, pl_2 est nettement lié au centromère. Le pourcentage de tétratypes obtenu pour le couple pl_2-tr_1 permet d'estimer la distance de pl_2 au centromère à 3 *uco* en utilisant l'abaque de PRÉVOST.

Si on admet cette valeur 3 *uco* pour la distance de pl_2 au centromère, nous pouvons constater que le pourcentage de tétratypes obtenus pour le couple pl_2-signe est plus élevé que ce que la distance signe-centromère (19 *uco*) ne le laisse prévoir. Cette remarque confirme l'observation effectuée dans le paragraphe précédent pour l'étude du couple tr_1-signe.

III. — Recherche de mutations indépendantes

A. — Mise en évidence de nouvelles mutations

Les résultats du paragraphe précédent montrent d'une part une situation simple, d'autre part un résultat intéressant. Deux mutations indépendantes vers le caractère colonie lisse sont dues chaque fois à la mutation d'un seul gène vers un allèle récessif ; les ségrégations mettent toujours en évidence dans la descendance d'un croisement plissé × lisse l'intervention d'un seul gène. Mais les deux mutations obtenues ne sont pas alléliques et se complémentent chez le diploïde qui a un phénotype sauvage. De plus, elles sont situées très différemment, l'une étant liée au centromère et l'autre non. Il est donc possible qu'un grand nombre de loci non alléliques et non liés entre eux puissent être à l'origine d'un phénotype lisse. Il serait intéressant de connaître combien de loci non alléliques et non liés peuvent, en mutant, donner chacun le caractère colonie lisse.

Pour tenter une approche de ce problème, j'ai isolé un certain nombre de mutations d'origine indépendante à partir des souches C et D. Afin d'être assuré que chaque mutation provient d'un événement génétique indépendant, j'ai procédé comme suit :

Quelques clones plissés d'origine monocellulaire sont isolés par étalement sur milieu gélosé à base d'acide lactique et prélèvement d'une colonie plissée. Ces clones plissés sont cultivés indépendamment sur un milieu liquide à base d'acide lactique (G lactate). Après avoir effectué une dizaine de générations cellulaires, ces cultures sont étalées sur un milieu solide à base d'acide lactique. A partir de chaque clone, je n'ai prélevé qu'une seule colonie lisse. Il est ainsi certain que chaque colonie isolée provient d'un événement mutationel indépendant. J'ai procédé de cette façon pour les deux souches en prélevant au total 8 clones lisses nouveaux pour chacune des deux souches D et C. Leur nomenclature a été calquée sur le même principe que pour les deux premiers mutants étudiés ; nous les désignons donc comme suit :

CL_2	DL_2
CL_3	DL_3
CL_4	DL_4
CL_5	DL_5
CL_6	DL_6
CL_7	DL_7
CL_8	DL_8
CL_9	DL_9

Des tests fonctionnels d'allélisme ont été effectués systématiquement. Ces diverses souches mutantes d'origine indépendante ont été toutes croisées avec les deux souches précédemment étudiées CL_1 et DL_1 ou avec leurs descendants porteurs de pl_1 ou pl_2. Ces divers mutants ont été classés ainsi en 2 catégories. Si le phénotype du diploïde obtenu en croisant avec une des souches tests est lisse, la mutation est non complémentaire et, par conséquent, allélique du gène présent dans la souche test. Si au contraire les diploïdes obtenus en croisant avec les différentes souches tests présentent tous le phénotype sauvage, la mutation étudiée est complé-

mentaire, c'est-à-dire, non allélique, des gènes mutés présents dans les différentes souches tests. Cette mutation est donc nouvelle et sera étudiée séparément ; elle deviendra à son tour une nouvelle souche test.

Pour cette étude j'ai pris comme souches tests les quatre souches suivantes :

$$CL_1 \ \alpha \ pl_1 PL_2 ur_1$$
$$2/25d \ a \ pl_1 PL_2 tr_1$$
$$DL_1 \ a \ PL_1 pl_2 tr_1 me_1$$
$$3/18a \ \alpha \ PL_1 pl_2 ur_1$$

Les résultats sont consignés dans le tableau 17. La mutation du gène pl_2 n'a été retrouvée qu'une seule fois chez le mutant DL_2. Par contre, la mutation pl_1 a été trouvée 4 fois (DL_4 ; CL_3 ; CL_5 ; CL_8) et est apparue chez les deux souches étudiées. Il est remarquable que, sur 16 mutations indépendantes étudiées, j'en ai trouvé 11 nou-

TABLEAU 17

Test fonctionnel d'allélisme. Étude de 16 mutations indépendantes

Mutants à tester	Souches-tests				Gène mis en évidence
	CL_1 pl_1 PL_2	2/25 *d* pl_1 PL_2	3/18 *a* PL_1 pl_2	DL_1 PL_1 pl_2	
CL_2	—	P	—	P	nouveau
CL_3	—	L	—	P	pl_1
CL_4	—	P	—	P	nouveau
CL_5	—	L	—	P	pl_1
CL_6	—	P	—	P	nouveau
CL_7	—	P	—	P	nouveau
CL_8	—	L	—	P	pl_1
CL_9	—	P	—	P	nouveau
DL_2	P	—	L	—	pl_2
DL_3	P	—	P	—	nouveau
DL_4	L	—	P	—	pl_1
DL_5	P	—	P	—	nouveau
DL_6	P	—	P	—	nouveau
DL_7	P	—	P	—	nouveau
DL_8	P	—	P	—	nouveau
DL_9	P	—	P	—	nouveau

Le phénotype des diploïdes obtenus dans chaque croisement test est indiqué par les lettres majuscules P (plissé) ou L (lisse). La dernière colonne donne le gène mis en évidence ; la mention « nouveau » est utilisée chaque fois que le gène muté n'est ni pl_1 ni pl_2.

velles. Ce premier résultat acquis j'ai entrepris d'effectuer systématiquement des tests fonctionnels d'allélisme entre ces divers mutants. Il était important de déterminer si ces onze mutations nouvelles appartenaient ou non à la même unité de fonction. J'ai croisé d'abord systématiquement entre eux tous ceux qui pouvaient l'être (les clones issus de C par ceux de D). J'ai utilisé ensuite comme souche test, des descen-

dants lisses issus du croisement de chacun de ces mutants avec une souche sauvage. Ces croisements seront décrits en détail ultérieurement. Je ne discuterai ici que les résultats finaux de l'ensemble des tests fonctionnels d'allélisme qui sont groupés dans le tableau 18. Il apparaît tout de suite que les 11 mutants nouveaux ne sont pas identiques entre eux. Certaines mutations ne se sont produites qu'une fois dans nos cultures ; ce sont celles portées par les mutants : CL_7 ; DL_3 ; DL_5 ; et DL_9. Ces quatre mutations ne sont allèles d'aucune autre ; chacune d'entre elles donne une complémentation dans le diploïde lorsqu'elle est croisée avec les 10 autres mutants. Une mutation identique semble par contre être intervenue dans les trois souches : CL_2 ; DL_6 ; DL_7 ; Le croisement de ces trois souches entre elles ou de leur descendants lisses donne des diploïdes colonie lisse. Cependant, il faut noter que le croisement de CL_2 par l'un ou l'autre des deux autres mutants donne quelques rares diploïdes plissés en mélange parmi un grand nombre de diploïdes lisses. Il est possible que CL_2 porte une

TABLEAU 18

Test fonctionnel d'allélisme entre les 11 mutants nouveaux

	CL_2	CL_4	CL_6	CL_7	CL_9	DL_3	DL_5	DL_6	DL_7	DL_8	DL_9
CL_2	L	P	P	P	P	P	P	L	L	P	P
CL_4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	L	P
CL_6	P	P	P	P	L	P	P	P	P	P	P
CL_7	P	P	P	.	.	P	P	P	P	P	P
CL_9	P	P	L	.	.	P	P	P	P	.	.
DL_3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DL_5	P	P	P	P	P	P	.	P	P	.	.
DL_6	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DL_7	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DL_8	P	L	P	P	.	P	.	P	P	.	.
DL_9	P	P	P	P	.	P	.	P	P	.	.

Pour ces croisements réciproques, une souche déterminée est croisée systématiquement avec chacune des souches de signe opposé. Un descendant colonie lisse de cette même souche, issu de son croisement avec une souche plissée, est choisi de signe convenable pour être croisé avec les autres souches. Cette même souche-test fille sert également à effectuer un back cross avec la souche mère.

Dans le tableau, seul le numéro de la souche mutante est indiqué ; il est donc sous entendu qu'une souche descendante de signe opposé portant le même gène muté la remplace chaque fois que les conditions de signe l'exigent.

Le phénotype des diploïdes obtenus est représenté par la lettre : P (plissé) ou L (lisse).

mutation hétéroallélique de celle qui est apparue dans les deux autres souches. Un autre groupe est constitué par les souches CL_4 et DL_8 dont le croisement donne des diploïdes lisses ; ces souches portent donc des mutations alléliques. Les souches CL_6 et CL_9 portent également des mutations alléliques ; leur croisement direct est impossible mais les croisements entre leurs descendants lisses donnent toujours des diploïdes lisses. En résumé j'ai pu grouper ces 11 mutants en 7 groupes appartenant à des unités

de fonction différentes grâce aux tests fonctionnels d'allélisme. Ces sept groupes sont les suivants :

CL_2 ; DL_6 ; DL_7
DL_3
CL_4 ; DL_8
DL_5
CL_6 ; CL_9
CL_7
DL_9

Je vais étudier rapidement ces diverses mutations : les tests d'allélisme ont montré qu'elles appartenaient à des unités de fonction différentes, mais il convient de vérifier si leur localisation génétique est indépendante.

B — Étude de la mutation pl_3.

Nous avons vu qu'une mutation commune existe chez les souches CL_2 ; DL_6 et DL_7 ; cette mutation ne porte ni sur pl_1 ni sur pl_2. Le croisement de CL_2 par un clone plissé DP a donné un diploïde plissé (n°16). La descendance de ce diploïde a été particulièrement difficile à étudier car la germination était très défectueuse et entraînait une forte mortalité. J'ai disséqué 20 asques à 4 spores viables ; tous ces asques donnent une ségrégation anormale pour l'uracile. La ségrégation des autres marqueurs est normale pour 12 asques qui donnent 2 spores plissées et 2 spores lisses.

TABLEAU 19

Étude de la descendance du diploïde 150 : $CP_1 \times DL_7$
$(\alpha PL_1PL_2PL_3ad_3\text{-}_3ad_6ur_1)$ $(aPL_1PL_2pl_3ad_3\text{-}_6ad_2hi_1tr_1me_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_3-tr_1	2	0	16	44	88
pl_3-signe	1	6	11	64	61
pl_3-me_1	2	4	12	55	66
pl_3-ur_1	4	3	11	47	61

Résultats de l'analyse des tétrades :

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (D P), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

Enfin les 8 autres asques étudiés donnent des ségrégations anormales pour tous les marqueurs ; l'aspect lisse ou plissé est souvent difficile à préciser dans la descendance de ces 8 asques qui donnent souvent une ségrégation 3-1 ou 1-3. Il paraît probable que la souche CL_2 est aneuploïde et donne une asyndèse partielle. Chaque fois que cette souche a été utilisée dans les croisements des ségrégations aberrantes se sont produites dans la descendance. Nous avons vu précédemment que quelques diploïdes plissés apparaissent parmi une majorité de diploïdes lisses dans les croisements de CL_2 par DL_6 et DL_7 ; j'ai émis l'hypothèse que les mutations observées dans CL_2 d'une part et dans DL_6 et DL_7 d'autre part étaient hétéroalléliques. Il n'est pas impossible que cette observation s'explique simplement par l'aneuploïdie de CL_2. Quoiqu'il en soit, l'étude de cette souche a été abandonnée.

La souche DL_7 croisée avec CP_1 a donné le diploïde plissé n° 150. Tous les asques disséqués de la souche 150 donnent 2 plissées : 2 lisses. La mutation de DL_7 est donc monofactorielle ; je désignerai le gène muté par pl_3. J'indique dans le tableau 19 les ségrégations obtenues pour les divers caractères. La disjonction de pl_3 et de tr_1 indique (88 p. 100 de tétratypes) que le locus de pl_3 n'est pas lié au centromère. De plus,le gène pl_3 ne semble lié à aucun des marqueurs utilisés d'après les pourcentages de recombinaison observés.

Un croisement en retour 150/5b × DL_7 donne un diploïde n° 184 de phénotype lisse. Sa descendance est entièrement lisse ; j'ai disséqué 5 asques normaux pour les marqueurs qui ont donné 0 plissée-4 lisses.

J'ai utilisé cette même souche 150/5b (α ; PL_1 ;PL_2 ; pl_3 ; ur_1) ainsi que la souche-mère DL_7 : (a ; PL_1 ; PL_2 ; pl_3 ; ad_{3-6} ; ad_{2-2} ; hi_1 ; tr_1 ; me_1) pour effectuer les tests d'allélismes décrits au paragraphe III-A.

C — Étude de la mutation pl_4

La souche DL_3 ne porte aucune des trois mutations qui viennent d'être décrites pl_1 pl_2 et pl_3. Croisée avec un subclone plissé (DP_1) elle a donné le diploïde plissé n°21. La dissection de cette souche nous a donné 9 asques normaux pour les marqueurs, tous ont donné 2 plissées : 2 lisses. La mutation porte donc sur un seul gène que nous appellerons pl_4. Le tableau 20 indique les ségrégations obtenues pour les divers marqueurs. Le nombre d'asques disséqués est faible, ce qui réduit la précision des résultats obtenus Le gène pl_4 ne semble lié à aucun des marqueurs utilisés. Cependant, la disjonction des couples pl_4PL_4 et tr_1TR_1 donne un résultat important : le pourcentage de tétratypes est faible (22 p. 100). Le gène pl_4 semble donc être lié au centromère ; la distance de pl_4 au centromère peut être évaluée en utilisant les abaques de Prévost à 11 *uco*. Cette estimation est naturellement très approximative en raison du faible nombre de tétrades analysées et ne peut être considérée que comme une simple indication. Un croisement en retour effectué avec la souche 21/2*c* (α ; $PL_1PL_2PL_3pl_4ur_1$) a donné un diploïde n° 127 de phénotype lisse. Sept asques disséqués normaux pour les marqueurs donnent 0 plissée : 4 lisses. Ce résultat confirme donc que la mutation pl_4 est monofactorielle.

Les tests fonctionnels d'allélisme ont été réalisés avec les souches :

DL_3 (a ; PL_1 ; PL_2 ; PL_3 ; pl_4 ; ad_{3-6} ; ad_2 ; hi_1 ; tr_1; me_1)

TABLEAU 20

Étude de la descendance du diploïde 21 : $CP_1 \times DL_3$

$(\alpha PL_1PL_2PL_3PL_4 ad_3\text{-}_3 ad_6 ur_1) \times (a PL_1PL_2PL_3 pl_4 ad_3\text{-}_3 ad_2 hi_1 tr_1 me_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_4-tr_1	3	4	2	55	22
pl_4-signe	3	1	5	39	55
pl_4-me_1	0	5	4	77	44
pl_4-ur_1	2	0	7	39	77

Résultats de l'analyse des tétrades :

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT) le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

TABLEAU 21

Étude de la descendance du diploïde 135 : $CL_4 \times DP_1$

$(\alpha PL_1PL_2PL_3PL_4 pl_5 ad_3\text{-}_3 ad_6 ur_1) \times (a PL_1PL_2PL_3PL_4PL_5 ad_3\text{-}_6 ad_2 hi_1 tr_1 me_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_5-tr_1	2	2	10	50	71
pl_5-signe	0	4	10	64	71
pl_5-me_1	0	1	13	53	92
pl_5-ur_1	2	3	9	53	64

Résultats de l'analyse des tétrades :

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

et 21/1a (aPL_1 $PL_2PL_3pl_4ur_1me_1$) d'une part, et avec les souches 21/2c et 21/5b ($\alpha PL_1PL_2PL_3pl_4ur_1tr_1$) d'autre part. Rappelons que la mutation pl_4 n'a été décelée dans aucune autre des souches mutantes.

D. — Étude de la mutation pl_5

Croisée avec DP_1, la souche CL_4 a donné un diploïde plissé n° 135. J'ai obtenu à partir de cette souche 14 asques normaux pour les marqueurs qui présentent tous une ségrégation 2 plissées : 2 lisses. Ces résultats montrent que la mutation étudiée est monofactorielle. Le gène ainsi mis en évidence est différent des 4 précédents : nous le désignerons par pl_5. La ségrégation des divers caractères étudiés est donnée dans le tableau 21 ; il apparaît que pl_5 n'est pas lié au centromère et est indépendant de tous les marqueurs. Le croisement en retour effectué avec la souche 135/1a (a ; $PL_1PL_2PL_3PL_4pl_5me_1TR_1$) a donné le diploïde n° 164 de phénotype lisse. Ce diploïde donne une ségrégation 0 plissée : 4 lisses pour les 12 asques disséqués. Les tests fonctionnels d'allélisme ont été réalisés avec les souches CL_4 et 135/1a. Rappelons que la mutation de PL_5 vers pl_5 a été mise en évidence dans la souche DL_8.

E. — Étude de la mutation pl_6

La souche DL_5 porte une mutation qui n'a été mise en évidence chez aucun autre mutant. Elle a été croisée avec CP_1 ; nous avons ainsi obtenu le diploïde plissé n° 156. Cette souche a donné 25 asques normaux pour les marqueurs, qui présentent tous une ségrégation : 4 plissées 0 lisse. Dans quelques cas, une spore sur quatre donne un clone caractérisé par des colonies de petite taille ; ces petites colonies sont plissées mais gardent un aspect légèrement boursouflé pendant plusieurs jours avant de plisser nettement.

Afin de vérifier ce résultat j'ai refait le croisement $CP_1 \times DL_5$. Le diploïde n° 185 ainsi obtenu a donné 27 asques normaux pour les marqueurs. Dans tous les cas, la ségrégation a donné 4 plissées : 0 lisse. Tous ces descendants de 156 et 185 ont été soigneusement testés à plusieurs reprises ; ils sont tous plissés. Ce caractère est stable dans la multiplication végétative.

J'ai voulu compléter l'étude de cette mutation en effectuant un croisement avec une souche colonie lisse. Le croisement $DL_5 \times CL_4$ a donné le diploïde n° 153 de phénotype plissé. Rappelons que le génotype de CL_4 est :

$$\alpha PL_1 ; PL_2 ; PL_3 ; PL_4 ; pl_5 ; ad_{3-3} ; ad_6 ; ur_1.$$

La souche 153 a donné 8 asques normaux pour les marqueurs ; j'ai obtenu pour tous : 2 plissées : 2 lisses. La ségrégation monofactorielle obtenue semble due au gène pl_5 apporté par la souche CL_4. La ségrégation des marqueurs (tabl. 22) n'infirme pas ce point de vue puisque le facteur lisse est indépendant du centromère comme pl_5.

La mutation observée chez DL_5 ne donne donc pas de ségrégations mendéliennes. Le croisement de cette souche avec un clone plissé donne une descendance entièrement plissée. Son croisement avec une souche mutante colonie lisse donne également un diploïde plissé ; la ségrégation observée dans ce cas est monogénique ce qui revient à dire que DL_5 n'a apporté aucun facteur « colonie lisse » transmissible à la descendance.

D'autre part, j'ai constaté par la suite la présence de nombreuses mutations réverses dans la souche DL_5. L'étalement du stock sur boîtes de Pétri contenant du milieu C donne des colonies lisses et plissées en mélange. Je n'ai pas fait une étude méthodique de ce phénomène. Mais le nombre de colonies plissées obtenu par étalement du stock est beaucoup trop élevé pour pouvoir être expliqué par l'apparition de mutation réverse à un taux habituel.

TABLEAU 22

Étude de la descendance du diploïde 153 : $CL_4 \times DL_5$

$(\alpha PL_1PL_2PL_3PL_4 pl_5 ad_3\text{-}_3 ad_6 ur_1) \times (a PL_1PL_2PL_3PL_4PL_5 ad_3\text{-}_6 ad_2 hi_1 tr_1 me_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes
pl_5-tr_1	0	1	7
pl_5-signe	2	2	4
pl_5-me_1	0	1	7
pl_5-ur_1	1	0	7

Résultats de l'analyse des tétrades. Le nombre d'asques étant très faible, les pourcentages de recombinaison et de tétratypes n'ont pas été calculés.

La souche DL_5 est porteuse d'un facteur responsable du phénotype lisse ; ce facteur ne se manifeste dans la descendance d'aucun des croisements effectués avec cette souche.

En résumé, le phénotype lisse observé dans DL_5 ne semble pas dû à une mutation génique. Cette mutation mériterait une étude plus détaillée.

F. — Étude de la mutation pl_7

Je vais étudier maintenant la mutation mise en évidence dans les souches CL_9 et CL_6. Le croisement de CL_6 avec la souche plissée DP_1 a donné le diploïde plissé n° 168. J'en ai disséqué 12 asques qui ont présenté une ségrégation 2 plissées : 2 lisses. La mutation considérée est donc monofactorielle ; nous appellerons le gène mis ainsi en évidence pl_7. Les résultats des disjonctions avec les divers marqueurs sont donnés dans le tableau 23. Les pourcentages de recombinaison ne sont pas très différents de 50 p. 100 et il ne semble pas que le gène pl_7 soit lié aux divers marqueurs.

Le pourcentage de tétratypes pour le couple $tr_1 pl_7$ est assez faible (41 p. 100) ; il en est de même pour le couple pl_7-signe (50 p. 100). Le nombre d'asques disséqués étant faible (N = 12), l'erreur effectuée sur la détermination du pourcentage de tétratypes est importante.

La déviation observée du pourcentage de tétratypes par rapport au pourcentage théorique n'est pas significative et il n'est pas possible de déterminer si pl_7 est réellement lié au centromère. Un croisement en retour a été réalisé avec la souche

168/4*b* (*a* ; pl_7 ; me_1 ; tr_1) ; le diploïde n° 186 obtenu est lisse et donne une descendance entièrement lisse. Les 9 asques disséqués ont donné 0 plissée : 4 lisses.

TABLEAU 23

Étude de la descendance du diploïde 168 : $CL_6 \times DP_1$

($\alpha PL_1PL_2PL_3PL_4PL_5pl_7ad_3\text{-}_3ad_6ur_1$) × ($aPL_1PL_2PL_3PL_4PL_5PL_7ad_3\text{-}_6\ ad_2\ hi_1\ tr_1\ me_1$)

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_7-tr_1	4	3	5	45	41
pl_7-signe	1	5	6	66	50
pl_7-me_1	3	1	8	42	66
pl_7-ur_1	1	2	9	54	75

Résultats de l'analyse des tétrades.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\,DR) \times 100}{2\,(TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

Les tests fonctionnels d'allélisme ont été réalisés avec les souches 168/4*b* et CL_6. Rappelons que la mutation pl_7 a été mise en évidence dans la souche CL_9.

G. — Étude de la mutation pl_8

Aucune des mutations précédentes n'a été mise en évidence chez la souche DL_9. Je l'ai croisée avec CP_1 ; le diploïde plissé n° 175 ainsi obtenu a donné une ségrégation monogénique 2 plissées : 2 lisses pour les 17 asques étudiés. Le gène mis en évidence sera pl_8. La ségrégation du gène pl_8 avec les divers marqueurs a été étudiée ; les résultats en sont donnés dans le tableau 24. Le gène pl_8 apparaît indépendant de tous les marqueurs. Il est par contre assez fortement lié au centromère d'après l'étude de la ségrégation de pl_8 et de tr_1. La distance de pl_8 au centromère peut être estimée à 3 *uco* en utilisant l'abaque de Prévost. Cependant il faut insister sur le manque de précision de cette estimation qui n'est donnée qu'à titre indicatif, et ne peut être considérée comme une localisation du gène sur le chromosome. Un croisement en retour a été effectué en utilisant la souche 175/1*b* (α ; pl_8 ; ur_1 ; me_1). Le diploïde 199 issu de ce croisement est lisse ; sa descendance est entièrement « colonie 1 sse ». Mais la germination des spores de cette souche est extrêmement

mauvaise et je n'ai pas pu obtenir d'asques à 4 spores viables. De plus, la sporulation de cette souche 199 est extrêmement faible. Il faut noter au passage que les souches

TABLEAU 24

Étude de la descendance du diploïde 175 : $CP_1 \times DL_9$

$CP_1 : \alpha PL_1PL_2PL_3PL_4PL_5PL_7PL_8 ad_3\text{-}_3 ad_6 ur_1$

$DL_9 : a PL_1PL_2PL_3PL_4PL_5PL_7 pl_8 ad_3\text{-}_6 ad_2 hi_1 tr_1 me_1$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_8-tr_1	7	9	1	56	5
pl_8-signe	3	0	14	41	82
pl_8-me_1	1	2	14	52	82
pl_8-ur_1	4	3	10	47	58

Résultats de l'analyse des tétrades.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), e pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\ DR) \times 100}{2\ (TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

diploïdes « colonies lisses » donnent généralement une sporulation peu abondante. Nous avons utilisé pour les tests fonctionnels d'allélisme les souches DL_9 et 175/1*b*. La mutation pl_8 n'a pas été trouvée dans d'autres souches que DL_9.

H. — Étude de la mutation pl_9

Le dernier type de mutation qui reste maintenant à étudier est représenté par un seul mutant CL_7. Cette souche présente des aspects curieux au microscope : taille très grande, formes en boudin, en poire ou au contraire parfaitement rondes, quelquefois les cellules ont des becs allongés comme des figures de copulation.

Le croisement avec DP_1 donne un diploïde n° 176 de phénotype plissé. J'ai obtenu 14 asques normaux pour les marqueurs à partir de cette souche. Notons d'abord que la totalité de la descendance est phénotypiquement plissée. Cependant on peut distinguer deux cas : certaines souches donnent des colonies plissées, de taille homogène ; d'autres souches présentent des colonies de taille variable. Dans ce dernier cas, les grandes colonies sont typiquement plissées, tandis que les colonies de petite taille ont souvent un aspect intermédiaire.

D'autre part, certaines souches ont un aspect microscopique normal alors que d'autres présentent les anomalies observées dans CL_7 ; à de très rares exceptions près

les souches ayant des colonies de taille hétérogène et d'aspect variable sont celles qui ont des cellules anormales. Sur les 14 asques étudiés, 12 ont donné une ségrégation 2 : 2.

Dans une de ces tétrades, deux spores donnent naissance à des souches normales cellules régulières et ovales ; colonies de taille homogène et de phénotype plissé typique. Les deux autres spores donnent au contraire des souches anormales : les cellules présentent des anomalies plus ou moins fréquentes ; la taille des colonies est très hétérogène et leur aspect très variable.

Cependant, 2 asques ont donné des ségrégations différentes avec toutes les combinaisons possibles :

— cellules et colonies normales ;
— cellules difformes et colonies hétérogènes ;
— cellules difformes et colonies normales ;
— cellules normales et colonies hétérogènes.

Ces deux asques exceptés, la ségrégation est simple 2 : 2. Mais si l'un des deux types obtenus est identique à un parent (plissé sauvage), l'autre est une forme nouvelle. L'aspect microscopique des cellules du parent mutant se retouve dans les descendants de ce type mais la morphologie coloniale est différente ; les colonies ne sont pas « lisses » mais plissées ou d'aspect intermédiaire.

Cependant, dans les étalements de ces souches à colonies de taille hétérogène et à cellules de forme anormale, il apparaît parfois quelques colonies à aspect pratiquement lisse. Plusieurs de ces colonies lisses ont été prélevées et étalées sur milieu C ; j'ai toujours obtenu un mélange de colonies lisses et plissées. Des subclonages en série ont été effectués. J'ai pu vérifier ainsi que l'instabilité des souches se maintient pendant plusieurs dizaines de générations cellulaires. Cependant, en prélevant systématiquement soit des « lisses » soit des « plissées » j'ai généralement obtenu un clone stable et homogène après plusieurs subclonages.

Le prélèvement et l'étalement de colonies plissées donne parfois aussi quelques colonies lisses ; mais dans ce cas, j'ai toujours obtenu une majorité de colonies plissées. En résumé, ces souches à colonies de taille et d'aspect hétérogène et à cellules anormales sont instables ; il est possible d'en extraire des clones instables pendant de nombreuses générations cellulaires.

Dans une de ces souches anormales j'ai prélevé au micromanipulateur des cellules d'aspect normal pour effectuer des subclonages d'origine bien déterminée. Certaines de ces cellules donnent une descendance homogène « colonies plissées » avec des cellules normales. Les autres donnent un mélange de colonies lisses et plissées ; les colonies lisses ainsi obtenues contiennent toujours de nombreuses cellules anormales.

Le prélèvement au micromanipulateur de formes anormales donne toujours des clones instables : mélange de colonies lisses et plissées, présence de cellules anormales en abondance. Il semble donc y avoir une liaison entre la présence de cellules de forme anormale et la possibilité pour un clone déterminé de donner des colonies lisses. Une cellule normale peut donner naissance à un clone instable mais des cellules de forme aberrante apparaissent alors dans sa descendance.

Ces observations pourraient faire penser à la ségrégation d'un seul couple de gènes PL_9 ; pl_9. L'allèle muté pl_9 conditionnerait l'apparition de formes cellulaires

anormales en même temps que la morphologie coloniale. Mais ce gène serait à expressivité variable ; les spores ayant hérité de l'allèle muté pl_9 donneraient des souches instables. Après une période d'instabilité, les cellules issues de ces spores pl_9 pourraient devenir irréversiblement « colonies lisses » ou au contraire « colonies plissées ». Toutefois, l'intervention d'un mécanisme extra-chromosomique ne peut être totalement exclue.

Il était utile de croiser CL_7 avec un mutant génique « colonie lisse » : 135/1a (a ; pl_5 ; me_1 ; tr_1). J'ai obtenu à partir de ce diploïde n° 166, 12 asques normaux pour les marqueurs avec une ségrégation 2 plissées : 2 lisses. Il n'y a pratiquement pas de cellules anormales dans la descendance de ce croisement ; quelques souches manifestent une certaine hétérogénéité dans la taille des colonies. Dans l'ensemble, la mutation présente chez CL_7 a peu marqué dans la descendance. La ségrégation monofactorielle 2 plissées : 2 lisses correspond à l'effet du couple PL_5pl_5, c'est-à-dire au facteur colonie lisse apporté par la souche 135/1a. Les ségrégations de ce gène pl_5 avec les divers marqueurs sont indiquées dans le tableau 25.

TABLEAU 25

Étude de la descendance du diploïde 166 : $CL_7 \times$ 135/Ia
$(\alpha ad_3\text{-}_3ad_6ur_1) \times (apl_5me_1tr_1)$

	Ditypes parentaux	Ditypes recombinés	Tétratypes	Pourcentage de recombinaison	Pourcentage de tétratypes
pl_5-tr_1	2	1	9	45	75
pl_5-signe	3	1	8	42	66
pl_5-me_1	3	0	9	37	75
pl_5-ur_1	0	2	10	58	83

Résultats de l'analyse des tétrades. La souche CL_7 est porteuse d'un facteur responsable de son phénotype lisse ; mais ce facteur ne s'est pas manifesté dans la descendance du croisement : $CL_7 \times$ 135/1a.

Ce tableau donne le nombre de ditypes parentaux (DP), de ditypes recombinés (DR) et de tétratypes (TT), le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{(TT + 2\,DR) \times 100}{2\,(TT + DR + DP)}$$

et le pourcentage de tétratypes :

$$\frac{(TT \times 100)}{(TT + DR + DP)}$$

ces résultats sont comparables à ceux précédemment obtenus pour le gène pl_5 (tableaux 21 et 22). Ces quelques observations ne sont pas favorables à l'hypothèse d'un contrôle génique de la mutation observée chez CL_7.

J'ai déjà rencontré chez DL_5 un phénotype lisse qui ne semble pas soumis à un contrôle génique. Le croisement de ces deux mutants : $CL_7 \times DL_5$ a donné le diploïde n° 161 de phénotype plissé. Les 21 asques normaux pour la ségrégation des marqueurs obtenus à partir de ce diploïde présentent une descendance entièrement

« colonie plissée ». La descendance de 161 présente de nombreuses analogies avec celle de 176. Certaines spores donnent des clones homogènes : les cellules sont normales et les colonies ont un phénotype plissé et une taille régulière. D'autres fournissent au contraire des clones anormaux : les cellules présentent des formes aberrantes ; les colonies sont de taille hétérogène et leur morphologie coloniale varie ; les colonies les plus grandes sont typiquement plissées alors que le phénotype des plus petites est extrêmement douteux et semble même parfois être « lisse ». J'ai obtenu pour 18 asques une ségrégation 2 : 2, c'est-à-dire 2 plissées normales : 2 plissées hétérogènes à cellules anormales. Cependant 3 asques ont donné des ségrégations

TABLEAU 26

Étude des relations de linkage entre les divers gènes pl.

Gènes	Croisements	Asques normaux pour les marqueurs				Pourcentage de recombinaison
		Total	DP	DR	TT	
$pl_1 \times pl_2$	$CL_1 \times DL_1$ (n° 1)	29	4	1	24	45
$pl_1 \times pl_3$	$DL_7 \times CL_1$ (n° 38)	15	4	8	3	63
$pl_1 \times pl_4$	$CL_1 \times DL_3$ (n° 25)	9	2	1	6	45
$pl_1 \times pl_5$	$CL_1 \times$ 135/1a (n° 163)	7	0	2	5	64
$pl_1 \times pl_7$	$CL_6 \times$ 2/25 d (n° 49)	6	0	1	5	58
$pl_1 \times pl_8$	$DL_9 \times CL_1$ (n° 42)	9	2	4	3	61
$pl_2 \times pl_3$	$DL_7 \times$ 3/18 a (n° 39)	6	0	0	6	50
$pl_2 \times pl_4$	$DL_3 \times$ 3/29 b (n° 116)	16	5	6	5	55
	$DL_3 \times$ 3/18 a (n° 76)	30	12	16	2	
	$DL_1 \times$ 21/2 c (n° 207)	4	1	1	2	
$pl_2 \times pl_5$	$CL_4 \times DL_1$ (n° 151)	14	4	3	7	46
$pl_2 \times pl_7$	$CL_6 \times DL_1$ (n° 170)	7	1	2	4	57
$pl_2 \times pl_8$	$DL_1 \times$ 175/1 b (n° 195)	7	1	6	0	96
$pl_3 \times pl_4$	150/5 b $\times DL_3$ (n° 211)	10	2	0	8	40
$pl_3 \times pl_5$	$DL_7 \times CL_4$ (n° 138)	9	2	1	6	45
$pl_3 \times pl_7$	$CL_6 \times DL_7$ (n° 173)	13	2	3	8	54
$pl_3 \times pl_8$	$DL_7 \times$ 175/1 b (n° 198)	10	1	3	6	60
$pl_4 \times pl_5$	$DL_3 \times CL_4$ (n° 66)	9	1	2	6	55
$pl_4 \times pl_7$	$CL_6 \times DL_3$ (n° 171)	6	1	1	4	50
$pl_4 \times pl_8$	$DL_3 \times$ 175/1 b (n° 196)	10	5	3	2	40
$pl_5 \times pl_7$	135/1 a $\times CL_6$ (n° 165)	14	1	4	9	61
$pl_5 \times pl_8$	$CL_4 \times DL_9$ (n° 155)	5	1	2	2	60
$pl_7 \times pl_8$	$CL_6 \times DL_9$ (n° 174)	10	1	3	6	60

différentes ; certains de leurs descendants ont des cellules normales malgré de grandes différences dans la taille et l'aspect des colonies, alors que d'autres ont des cellules anormales et des colonies homogènes. Ce croisement confirme que la mutation observée dans DL_5 est très instable et ne se transmet pas aux descendants de cette souche à travers la reproduction sexuée. De plus, la mutation de CL_7 apparaît nettement différente de celle de DL_5.

Il n'est pas possible d'émettre actuellement une hypothèse valable et simple pour expliquer le phénotype lisse des souches DL_5 et CL_7. Dans tout ce qui va suivre, je n'étudierai donc plus ces deux mutations.

IV. — Étude des relations de linkage

Au cours de l'étude de 16 mutations d'origine indépendante, j'ai mis en évidence la mutation de 7 gènes appartenant à des unités de fonction différentes mais déterminant tous le même phénotype. Il est intéressant de noter que 3 d'entre eux sont liés assez fortement au centromère alors que les 4 autres en sont indépendants.

TABLEAU 27

Résultats des divers croisements impliquant les gènes pl.

	pl_1	pl_2	pl_3	pl_4	pl_5	pl_7	pl_8
pl_1		$\frac{4 : 1}{24}$	$\frac{4 : 8}{3}$	$\frac{2 : 1}{6}$	$\frac{0 : 2}{5}$	$\frac{0 : 1}{5}$	$\frac{2 : 4}{3}$
pl_2	45-83		$\frac{0 : 0}{6}$	$\frac{18 : 23}{9}$	$\frac{4 : 3}{7}$	$\frac{1 : 2}{4}$	$\frac{1 : 6}{0}$
pl_3	63-20	50-100		$\frac{2 : 0}{8}$	$\frac{2 : 1}{6}$	$\frac{2 : 3}{8}$	$\frac{1 : 3}{6}$
pl_4	45-67	55-18	40-80		$\frac{1 : 2}{6}$	$\frac{1 : 1}{4}$	$\frac{5 : 3}{2}$
pl_5	64-71	46-50	45-67	55-67		$\frac{1 : 4}{9}$	$\frac{1 : 2}{2}$
pl_7	58-83	57-57	54-62	50-67	61-64		$\frac{1 : 3}{6}$
pl_8	61-33	86-0	60-60	40-20	60-40	60-60	

Dans la partie supérieure droite du tableau nous indiquons le nombre de ditypes parentaux (DP), ditypes recombinés (DR) et tétratypes (TT) suivant la représentation : $\frac{DP : DR}{TT}$

La partie gauche du tableau donne le pourcentage de recombinaison et le pourcentage de tétratype.

Il convient maintenant d'étudier les relations de linkage entre ces divers loci. Pour effectuer cette étude, j'ai réalisé un certain nombre de croisements (tabl. 26) et effectué l'analyse des tétrades pour les divers diploïdes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 27. La partie inférieure gauche de ce tableau à double entrée indique, pour tous les gènes *pl* pris deux à deux, le pourcentage de recombinaison suivi du pourcentage de tétratype. La partie supérieure droite du tableau

donne le résultat de l'analyse des tétrades : nombre de ditypes parentaux, de ditypes recombinés et de tétratypes en suivant la représentation :

$$\frac{\text{DP : DR}}{\text{TT}}$$

Les pourcentages de recombinaison trouvés sont tous voisins de 50 p. 100. Il apparaît nettement que les 7 gènes étudiés ne sont pas liés étroitement ; cependant le nombre d'asques étudiés est faible et je ne peux pas conclure à une absence complète de liaison. Ce résultat permet d'affirmer que les trois gènes liés au centromère (pl_2, pl_4, et pl_8) se trouvent sur des chromosomes différents. Les pourcentages de tétratypes observés pour les couples : pl_2-pl_4 ; pl_2-pl_8, et pl_4-pl_8 sont très nettement inférieurs à 67 p. 100 ; la liaison de ces trois loci au centromère se trouve ainsi confirmée.

V. — Recherche de réversions (pl) → (PL)

J'ai cherché à détecter des mutations réverses en cultivant des souches colonies lisses, de génotype connu, sur un milieu susceptible de favoriser les souches réversées colonies plissées. Le milieu utilisé avait la composition suivante : Yeast extract Difco 0,5 p. 100, glucose 5 p. 100, 5 ml de milieu liquide par tube à essais 18/18. Les cultures ne sont pas agitées.

Les levures utilisées étaient :

CL_1 dont le génotype est pl_1 ;
CL_3 dont le génotype est pl_1 ;
CL_2 dont le génotype est pl_3 ;
DL_1 dont le génotype est pl_2 ;
DL_2 dont le génotype est pl_2 ;
DL_3 dont le génotype est pl_4 ;
1/2*b* dont le génotype est $pl_1 pl_2$;
1/2*c* dont le génotype est $pl_1 pl_4$.

J'ai effectué 50 repiquages successifs ; l'ensemencement représentait chaque fois 1/20 de la culture environ. J'ai étalé sur milieu C les subcultures n° 10-20-30-40- et 50. En 50 repiquages la population de levure a effectué 200 générations cellulaires environ.

Le tableau 28 donne les pourcentages de colonies plissées obtenus dans ces divers étalements ; le nombre de colonies plissées effectivement dénombré et le nombre total de colonies étalées sont indiqués entre parenthèses. Il est donné dans le tableau le nombre approximatif de générations effectué par la levure entre le début de l'expérience et l'étalement. J'ai constaté l'apparition de colonies plissées dans les étalements des souches : 1/2 *b* ; CL_1 ; CL_3 ; DL_1 ; DL_2 ; DL_3. J'ai vérifié avec les marqueurs que les colonies plissées apparues, n'étaient pas des contaminations. Des mutations (pl) → (PL) ont donc été mises en évidence pour pl_1 pl_2 et pl_4 mais pas pour pl_3. Cependant les colonies plissées sont peu nombreuses ; elles ne semblent pas être favorisées par la sélection naturelle dans les cultures sur glucose.

TABLEAU 28

Pourcentage de colonies plissées apparues au cours des subcultures sur milieu glucosé de clones lisses à l'origine

Souches	Génotype	40 générations	80 générations	120 générations	160 générations	200 générations
CL_1	pl_1	< 1 % (5-1223))	0 (0-351)	0 (0-723)	9 % (59-688)	< 1 % (8-1702)
CL_3	pl_1	0 (0-245)	0 (0-326)	1 % (7-664)	25 % (252-1022)	< 1 % (1-1457)
CL_2	pl_3	0 (0-1321)	0 (0-216)	0 (0-1477)	0 (0-779)	0 (0-3877)
DL_1	pl_2	< 1 % (1-4100)	0 (0-644)	0 (0-1018)	0 (0-346)	< 1 % (6-1717)
DL_2	pl_2	1 % (44-3014)	2 % (7-314)	26 % (327-1251)	76 % (431-568)	98 % (1696-1724)
DL_3	pl_4	< 1 % (1-2162)	0 (0-746)	0 (0-1095)	0 (0-608)	0 (0-5787)
1/2*b*	pl_1 pl_2	0 (0-3960)	0 (0-472)	3 % (16-487)	4 % (64-1608)	23 % (847-3696)
1/2*c*	pl_1 pl_2	0 (0-2665)	0 (0-358)	0 (0-1040)	0 (0-8244)	0 (0-1416)

Le tableau donne les pourcentages de colonies plissées dans des clones lisses de levure de génotype connu (2e colonne) ayant effectué sur un milieu liquide riche en glucose un nombre déterminé de générations cellulaires (indiqué dans la première ligne du tableau). Les colonies plissées sont dénombrées par étalement sur milieu C (milieu gélosé à base d'acide lactique). Il est indiqué entre parenthèses le nombre de colonies plissées trouvées dans chaque étalement ainsi que le nombre total de colonies dénombrées.

Dans un seul cas, le pourcentage de plissées a augmenté au cours des subcultures (pour DL_2). Par ailleurs, j'ai constaté dans des expériences systématiques de sélection que les colonies plissées prenaient quelquefois le pas sur les colonies lisses dans les cultures sur glucose mais ce résultat est assez aléatoire et ne se produit pas systématiquement dans les mélanges lisse/plissé. L'avantage sélectif que pourraient avoir les colonies plissées sur glucose ne peut donc être qu'assez faible. De nombreuses réversions $(pl) \rightarrow (PL)$ ont été mises en évidence. Il n'est pas du tout certain que cette modification du phénotype corresponde à une mutation réverse du gène *pl* vers son allèle sauvage PL. Il est en effet peu probable qu'une double reversion $pl_1 \rightarrow PL_1$ et $pl_2 \rightarrow PL_2$ ait lieu dans la souche 1/2 *b*. Une mutation ayant provoqué l'apparition d'un gène suppresseur semble plus probable. Il sera intéressant d'étudier de façon plus approfondie le mécanisme de la reversion $(pl) \rightarrow (PL)$.

VI. — Discussion des résultats du chapitre III

L'étude de mutants colonie lisse a permis la mise en évidence de sept gènes indépendants : la présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés *pl* lui assure le phénotype lisse ; les gènes mutés sont récessifs. Trois gènes (pl_2, pl_4 et pl_8) sont liés au centromère.

Les marqueurs génétiques homologués et classés sont peu nombreux chez la levure (100 environ) ; il serait donc laborieux de situer les gènes *pl* indépendants du centromère sur la carte chromosomique de la levure. Par contre, il sera relativement aisé de localiser avec précision les loci de pl_2, pl_4 et pl_8 qui sont liés au centromère. L'utilisation de marqueurs génétiques liés au centromère a permis de mettre en évidence 13 chromosomes chez la levure (Carbondale Yeast Genetics Conference, 1961). Il sera donc facile de déterminer si ces trois loci nouvellement mis en évidence se trouvent sur l'un des chromosomes connus ; dans ce cas leur localisation précise sera possible. Éventuellement, ces trois loci pourraient permettre de marquer de nouveaux chromosomes. Sur 18 mutants étudiés nous avons obtenu 16 mutations donnant une ségrégation monofactorielle et 2 donnant des ségrégations difficilement interprétables.

Il est intéressant de noter que sur 16 mutations monofactorielles étudiées, 7 loci indépendants aussi bien pour les tests fonctionnels d'allélisme que pour les tests de recombinaison ont été mis en évidence. Ces mutations sont spontanées ; elles ont été isolées après une sélection dans des conditions de milieu qui favorisent ce type de mutants ; il ne semble donc pas qu'il y ait entre elles d'avantage sélectifs. Émettons l'hypothèse que la probabilité d'isoler un mutant pour un locus déterminé est identique pour tous les loci. Dans ces conditions, la courbe de fréquence obtenue en portant en abscisse le nombre K de mutations trouvé par loci et en ordonnée le nombre de loci ayant donné K mutations suit la loi de Poisson. Il est possible d'estimer ainsi le nombre de loci pour lesquels je n'ai pas obtenu de mutation (Prévost, G., *Communication personnelle*) ; il est environ de 3. Le nombre de loci contrôlant le caractère étudié est donc voisin de 10 ce qui est considérable. Ce nombre constitue une valeur minimum qui n'est acceptable que si l'hypothèse est exacte.

Résumé du chapitre III

Sur 18 mutants colonie lisse d'origine indépendante : 16 donnent une ségrégation monofactorielle et 2 des ségrégations difficilement interprétables. J'ai mis en évidence 7 gènes indépendants : la présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés lui assure le phénotype lisse ; les gènes mutés sont récessifs. Trois gènes (p_2, pl_4 et pl_8) sont liés au centromère. J'ai obtenu des réversions (pl) → (PL). Dans les conditions où j'ai opéré, l'intervention d'un suppresseur paraît plus probable qu'une mutation réverse des gènes pl vers leurs allèles sauvages PL.

CHAPITRE IV

ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA MUTATION COLONIE LISSE

I. — Introduction

Je viens de mettre en évidence 7 loci indépendants. D'une part, ces gènes contrôlent la vitesse de croissance de la levure sur acide lactique ; d'autre part, ils modifient la morphologie coloniale sur les milieux gélosés où ce substrat constitue la seule source de carbone. Il faut maintenant déterminer le mode d'action de ces mutations au niveau biochimique, il conviendra ensuite de contrôler si elles ont toutes un mécanisme physiologique analogue. J'étudierai également les relations de dominance entre les allèles PL_1 et *pl* en utilisant des critères physiologiques. Enfin, dans une dernière étape, je vérifierai si l'action de ces loci est additive lorsque plusieurs d'entre eux sont homozygotes pour l'allèle muté.

L'étude physiologique a été effectuée essentiellement avec trois souches diploïdes isogéniques ne différant que par un couple de gènes :

4 « colonie plissée » PL_1/PL_1 PL_5/PL_5 ;
183 « colonie lisse » PL_1/PL_1 pl_5/pl_5 ;
32 « colonie lisse » pl_1/pl_1 PL_5/PL_5.

En utilisant des souches diploïdes on évite certains inconvénients fréquents chez les levures haploïdes comme la croissance en rosette ; ce mode de croissance en petits flocons gêne de nombreuses déterminations physiologiques. D'autre part il est à craindre que des mutations colonie lisse soient sélectionnées dans les cultures de souches haploïdes sur acide lactique, une telle éventualité gênerait l'interprétation des résultats. Un gène *pl* étant récessif en présence de son allèle sauvage PL_1, l'envahissement par des mutants colonie lisse d'une culture sur acide lactique, même de longue durée, paraît exclue avec une souche diploïde homozygote pour les gènes PL_1/PL_1. La souche 4 vient du croisement 6 $153C9P_1$ × 4 $021D3P_1$. La souche 183 est issue du croisement 6 $153C9L_4$ × 4 $021D3L_8$ et la souche 32 du croisement 6 $153C9L_1$ × 4 $021D3L_4$. Les souches 183 et 32 sont homozygotes pour les gènes lisses correspondants pl_5 et pl_1 mais les mutations sont d'origine indépendante et pourraient donc être hétéroalléliques.

J'ai aussi utilisé des souches isogéniques hétérozygotes pour pl_1 et pl_5 :

2 « colonie plissée » PL_1/pl_1 PL_5/PL_5 ;
40 « colonie plissée » PL_1/pl_1 PL_5/pl_5 ;
135 « colonie plissée » PL_1/PL_1 PL_5/pl_5.

Enfin j'ai également étudié la souche 214 pl_1/pl_1 pl_5/pl_5 qui est issue du croisement 163/6*b* × 163/8*a* ; cette dernière souche n'est pas isogénique des précédentes.

II. — Étude de la respiration des acides lactiques et pyruvique chez la levure

Dans ce paragraphe je vais étudier les principaux coefficients métaboliques de la levure : bilan de la respiration des acides lactiques et pyruvique ; vitesse de la respiration de ces divers substrats par la levure cultivée soit sur glucose soit sur acide lactique. J'ai utilisé pour ces déterminations les souches 4, 32 et 183 ce qui a permis de contrôler l'effet de la mutation « colonie lisse » sur ces divers aspects du métabolisme de la levure.

Les expériences préliminaires décrites dans le chapitre I sont faites avec l'acide lactique du commerce c'est-à-dire un mélange d'acide L-lactique et d'acide D-lactique La respiration de l'acide lactique par la levure avait toujours été étudiée avec un mélange des deux isomères (Furth et Lieben, 1922 ; Meyerhof, 1925 ; Meyerhof et Lohman, 1926 ; Tore Levring, 1945).

Or, nous savons maintenant que la levure possède plusieurs lacticodéshydrogénases stéréospécifiques (Nygaard 1960-*a*, Singer, et *al.*, 1960). Trois lacticodéshydrogénases différentes sont maintenant identifiées. La levure. cultivée en anaérobiose possède une lacticodéshydrogénase (Slonimski, et Tysarowski, 1958) spécifique de l'acide D-lactique (Labeyrie, Slonimski, et Naslin 1959). Cette enzyme est active sur divers acides D α hydroxylés (Boeri, Cremona, et Singer, 1960). La levure cultivée en aérobiose possède deux enzymes : l'une est spécifique de l'acide L-lactique (Labeyrie, Slonimski, et Naslin 1959), l'autre est spécifique de l'acide D-lactique (Nygaard 1960-*b*). Il était permis de penser que la levure respire différemment les acides L et D-lactiques puisqu'elle possède des enzymes spécifiques pour chacun d'eux. L'étude physiologique a donc été conduite avec les acides L et D-lactiques séparément.

La déshydrogénation des deux acides lactiques aboutit à la formation d'acide pyruvique. Leur oxydation pouvait prendre ensuite une voie métabolique commune ; encore faut-il noter que deux voies métaboliques s'ouvrent devant l'acide pyruvique (Holzer, et Goedde 1957) (Holzer, 1961) : la décarboxylase pyruvique (Holzer et *al.*, 1956) et l'oxydase pyruvique (Alvarez, Vanderwinkel, et Wiame 1958).

Il a semblé utile dans ces conditions d'étudier également la respiration de l'acide pyruvique par la levure. Il est nécessaire de comparer, chez les souches sauvages et les souches mutantes, les différentes étapes du métabolisme de l'acide lactique pour localiser le niveau où agit la mutation colonie lisse. Cette étude peut donner également des indications sur le métabolisme des acides L et D-lactiques chez la levure.

A. — Bilan de la respiration

Le bilan de la respiration a été effectué avec des concentrations en acide limitantes dans l'appareil de Warburg. Les levures sont cultivées sur milieu synthétique à base de glucose et prélevées en fin de phase exponentielle. Les solutions de substrats ont été préparées comme décrit dans la première partie, § III.

a) *Étude de l'acide D-lactique*

L'absorption d'oxygène a été déterminée pour diverses concentrations d'acide D-lactique comprises entre 0,19 mM et 0,94 mM. Les cupules d'expériences contenaient respectivement : 342, 684, 1 026, 1 368 et 1 710 mμ molécules.

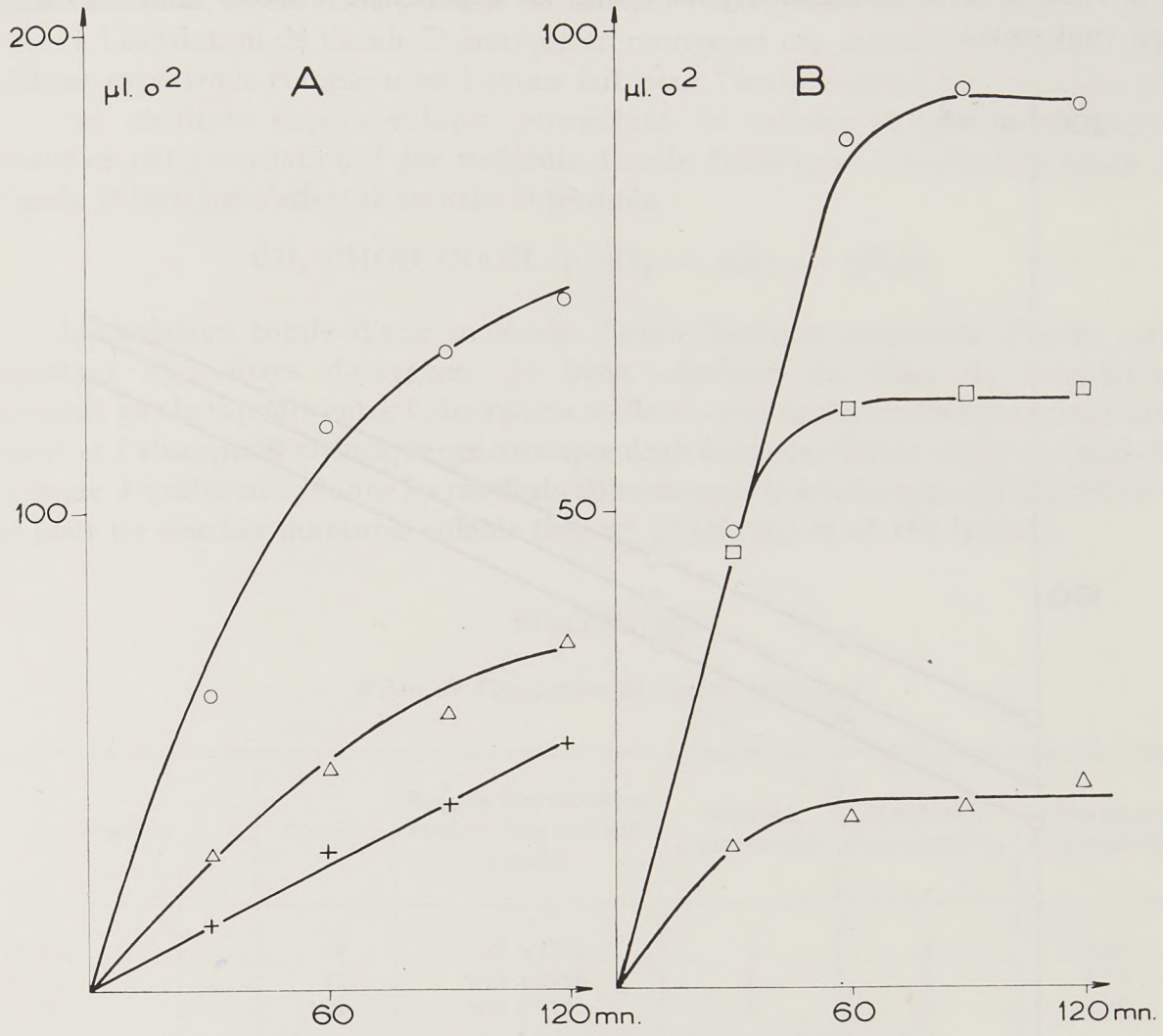


FIG. 4. — *Utilisation d'une quantité limitante d'acide D-lactique*
Souche n° 4

En abscisse : temps exprimé en minutes.
En ordonnée : absorption d'oxygène exprimée en µl.
A — Absorption totale d'oxygène dans une cupule en fonction du temps.
Cercles : avec 1 710 mμ molécules d'acide D-lactique dans la cupule.
Triangles : avec 342 mμ molécules.
Croix : en l'absence de substrat.
B — Absorption d'oxygène corrigée pour l'activité endogène, dans une cupule, en fonction du temps.
Cercles : avec 1 710 mμ molècules d'acide D-lactique dans la cupule.
Carrés : avec 1 026 mμ molécules.
Triangles : avec 342 mμ molécules.

Le graphique 4 A représente l'absorption totale d'oxygène par cupule, (exprimée en µl) en fonction du temps pour les deux concentrations extrêmes d'acide D-lactique ainsi que l'absorption d'oxygène par la même quantité de levure privée de substrat (activité endogène). Il apparaît nettement sur ce graphique que nous nous trouvons en présence de concentration en substrat limitante car la vitesse de

l'absorption d'oxygène n'est pas constante en fonction du temps. J'ai représenté sur le graphique 4B l'absorption totale d'oxygène corrigée de l'activité endogène, en fonction du temps : en corrigeant chaque point, pour l'absorption d'oxygène due à l'oxydation des substrats endogènes, j'obtiens les valeurs de l'absorption imputables à la seule oxydation du substrat étudié. Ce graphique montre que l'oxydation de l'acide D-lactique est terminée en deux heures dans nos conditions d'expérience. J'ai effectué cette vérification pour toutes les expériences utilisées dans les calculs qui vont suivre.

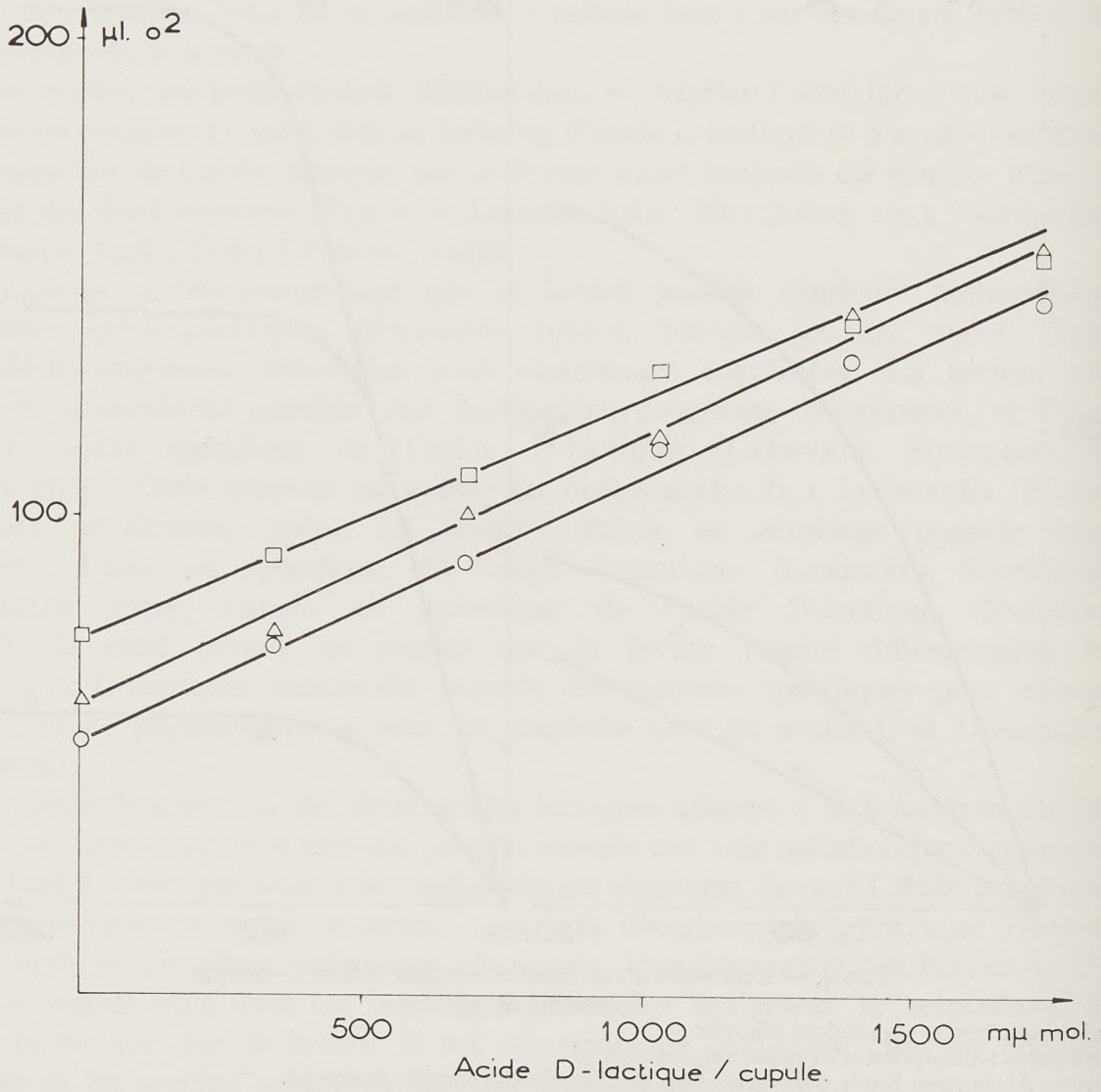


FIG. 5. — *Bilan de l'oxydation de l'acide D-Lactique*

En abscisse : quantité d'acide D-lactique, en mµ molécules, dans la cupule d'expérience.
En ordonnée : absorption totale d'oxygène exprimée en µl.
Cercles : souche 4.
Triangles : souche 183.
Carrés : souche 32.

Pour chaque expérience, le rendement a été calculé par intrapolation graphique ; j'ai porté en abscisse la quantité d'acide lactique contenue dans les cupules d'expérience exprimées en mµ molécules/cupule, et en ordonnée l'absorption totale d'oxygène en µl. Le graphique 5 donne les résultats obtenus pour quelques expériences.

L'absorption totale d'oxygène est proportionnelle à la quantité d'acide lactique contenue dans les cupules d'expérience ; cette linéarité du graphique indique que l'acide lactique constitue le seul facteur limitant de la réaction. D'autre part, l'extrapolation au zéro montre que l'addition d'acide D-lactique ne modifie la respiration endogène pour aucune des trois souches étudiées ; les valeurs obtenues par extrapolation pour la respiration endogène sont en effet toujours très voisines des résultats expérimentaux. Il est donc possible de calculer l'absorption nette d'oxygène imputable à l'oxydation de l'acide D-lactique en corrigeant des activités endogènes pour chaque expérience comme nous l'avons fait pour l'établissement du graphique 4 B.

Ces résultats expérimentaux permettent de calculer la quantité d'oxygène absorbée par l'oxydation d'une molécule d'acide D-lactique. L'oxydation totale de l'acide D-lactique s'effectue suivant la formule :

$$CH_3\ CHOH\ COOH + 3O_2 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O.$$

L'oxydation totale d'une molécule d'acide lactique consomme d'après cette équation 67,2 litres d'oxygène. Je peux effectuer un bilan de l'oxydation. exprimé par le rapport entre l'absorption réelle d'oxygène déterminée expérimentalement et l'absorption théorique qui correspondrait à une oxydation totale de l'acide D-lactique. Le tableau 29 donne les résultats obtenus pour la souche sauvage (PL/PL) n° 4 et pour les souches mutantes colonie lisse n° 32 (pl_1/pl_1) et n° 183 (pl_5/pl_5).

TABLEAU 29

Bilan de l'oxydation de l'acide D-lactique

Génotype	Souche	Zone de concentration étudiée (mμ mol par cupule)	Nombre d'expériences	Nombre de déterminations	Bilan moyen de l'oxydation
PL/PL	4	342 à 1710	1	5	0,86
pl_1/pl_1	32	342 à 1710	1	5	0,74
pl_5/pl_5	183	342 à 1710	1	5	0,81

Le bilan des oxydations est exprimé par le rapport entre l'absorption réelle d'oxygène et l'absorption théorique qui correspondrait à une oxydation totale de l'acide D-lactique ; la valeur indiquée représente la moyenne de plusieurs déterminations. Dans chaque expérience, le rendement a été déterminé pour 5 concentrations différentes.

Le bilan de l'oxydation de l'acide D-lactique est pratiquement identique pour les trois souches étudiées. La mutation colonie lisse ne modifie donc pas l'assimilation de l'acide D-lactique. La levure oxyde 80 p. 100 environ de l'acide D-lactique qui lui est fourni en le transformant en gaz carbonique et en eau ; les autres 20 p. 100 sont assimilés, c'est-à-dire incorporés dans les synthèses.

Le bilan de l'oxydation de l'acide D-lactique par la levure n'avait encore jamais été mesuré ; des mesures effectuées avec l'acide lactique commercial (mélange d'acide D

et d'acide L-lactique) avaient donné cependant des valeurs comparables (Tore Levring, 1945).

Il faut noter d'autre part que les Q_{CO_2} D-lactate ont des valeurs très voisines des Q_{O_2} D-lactate. Le quotient respiratoire de l'acide D-lactique est donc voisin de 1 ; la moyenne de 9 déterminations a donné 0,98.

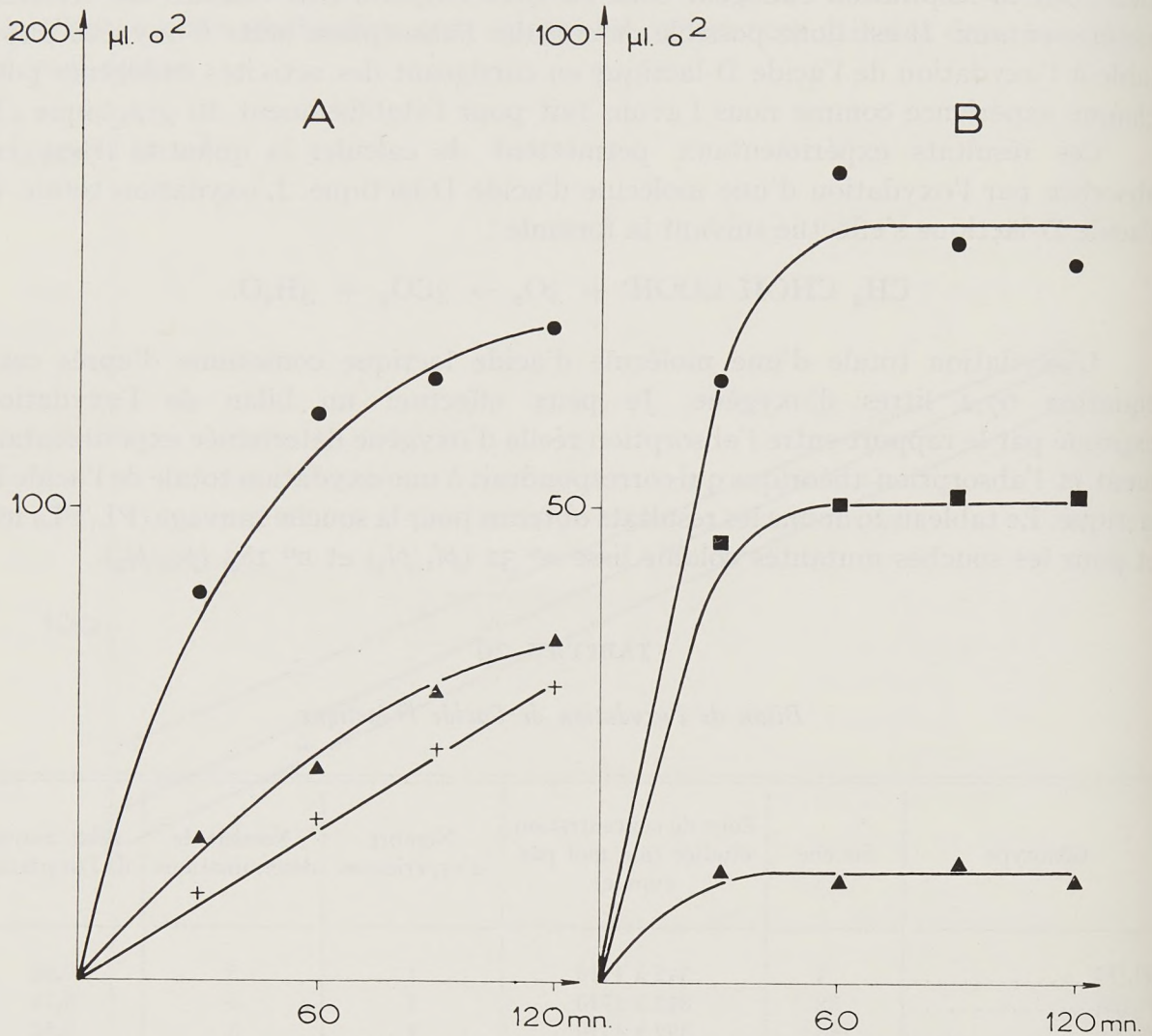


Fig. 6. — *Utilisation d'une quantité limitante d'acide L-lactique*

En abscisse : temps exprimé en minutes.
En ordonnée : absorption d'oxygène, exprimée en µl.

Souche n° 4

A — Absorption totale d'oxygène dans une cupule en fonction du temps.
Cercles : avec 1 710 mµ molécules d'acide L-lactique dans la cupule.
Triangles : avec 342 mµ molécules.
Croix : en l'absence de substrat.

B — Absorption d'oxygène corrigée pour l'activité endogène, dans une cupule, en fonction du temps.
Cercles : avec 1 710 mµ molécules d'acide L-lactique dans la cupule.
Carrés : avec 1 026 mµ molécules.
Triangles : avec 342 mµ molécules.

L'équation d'oxydation totale de l'acide D-lactique a été donnée au début du paragraphe : elle prévoit le dégagement de trois molécules de gaz carbonique pour l'absorption de trois molécules d'oxygène. L'oxydation totale de l'acide D-lactique donnerait un quotient respiratoire gaz carbonique dégagé/oxygène absorbé égal à 1. Bien que l'oxydation ne soit pas totale, le quotient respiratoire expérimental est égal

au quotient respiratoire théorique. La valeur observée, dans nos conditions de mesures, pourrait traduire le fait que les synthèses formées à partir de l'acide lactipue sont à prédominance glucidique. Le quotient respiratoire des glucides est en effet égal à 1 comme celui de l'acide lactique.

b) *Étude de l'acide L-lactique*

Le rendement des oxydations a été étudié suivant les mêmes protocoles que pour l'acide D-lactique. A titre d'exemple, le graphique 6 A représente, pour une expé-

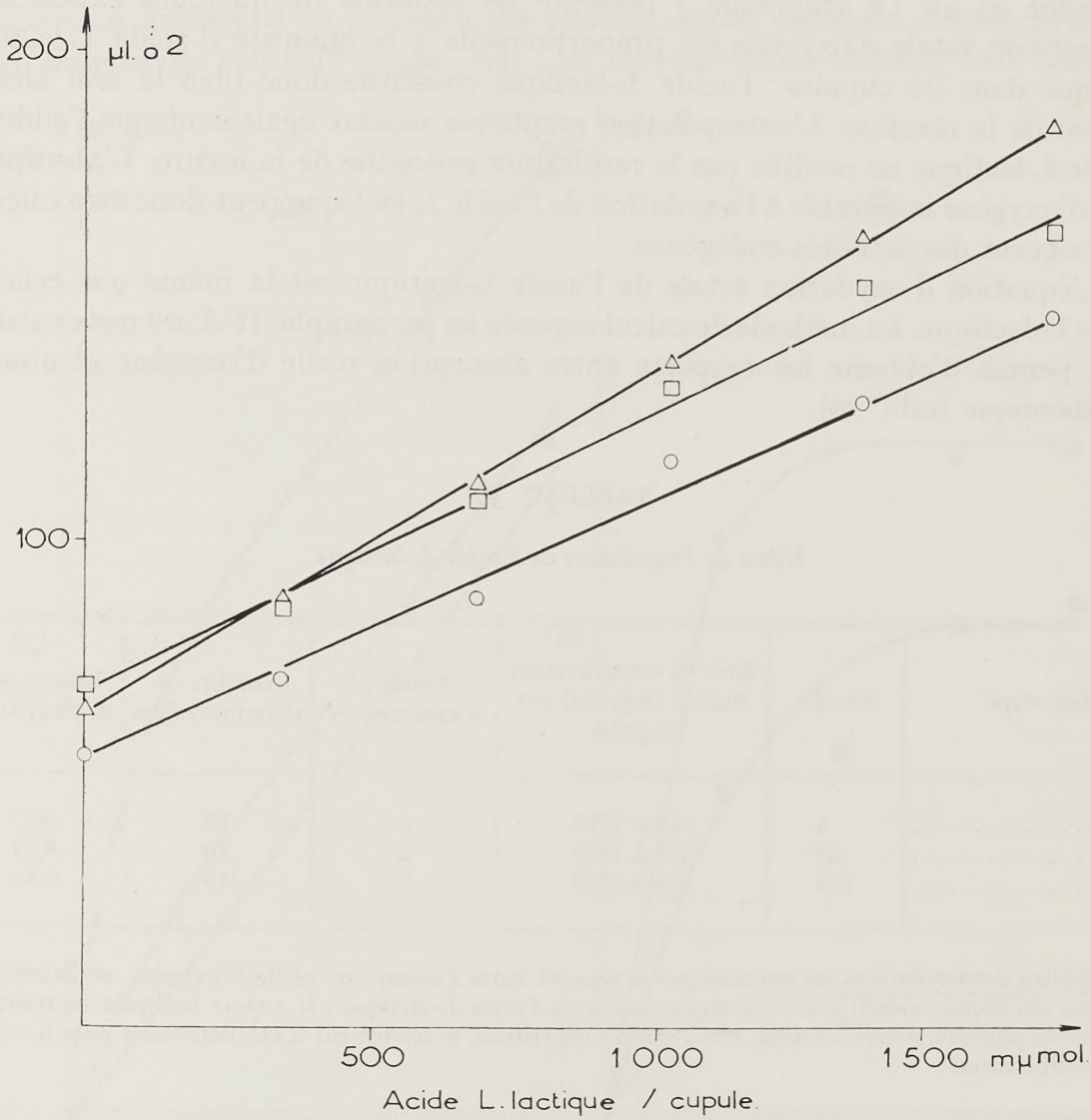


FIG. 7. — *Bilan de l'oxydation de l'acide L-lactique*

En abscisse : quantité d'acide L-lactique contenue dans la cupule d'expérience, exprimée en mµ molécules.
En ordonnée : absorption totale d'oxygène, exprimée en µl.
Cercles : souche 4.
Triangles : souche 183.
Carrés : souche 32.

rience, l'absorption totale d'oxygène par cupule en fonction du temps en présence des deux concentrations extrêmes d'acide L-lactique et en absence de substrat. Ce graphique confirme que les concentrations utilisées sont limitantes dans le cas de l'acide L-lactique puisque la vitesse d'absorption d'oxygène n'est pas constante en

fonction du temps. En représentant (graph. 6 B) pour diverses concentrations en acide L-lactique, l'absorption totale d'oxygène en fonction du temps, corrigée de l'absorption en l'absence de substrat (activité endogène), il est possible de mettre en évidence le fait que l'oxydation de l'acide L-lactique est terminée en deux heures dans nos conditions expérimentales. Cette vérification a été effectuée pour toutes les expériences.

Le calcul du rendement de l'oxydation de l'acide L-lactique a été effectué par intrapolation graphique ; on a porté en abscisse la quantité d'acide L-lactique contenue dans les cupules, exprimée en mμ molécules et en ordonnée l'absorption totale d'oxygène en μl. Le graphique 7 présente les résultats de quelques expériences. L'absorption totale d'oxygène est proportionnelle à la quantité d'acide L-lactique contenue dans les cupules ; l'acide L-lactique constitue donc bien le seul facteur limitant de la réaction. L'extrapolation graphique montre également que l'addition d'acide L-lactique ne modifie pas la respiration endogène de la levure. L'absorption nette d'oxygène imputable à l'oxydation de l'acide L-lactique peut donc être calculée en corrigeant des activités endogènes.

L'équation d'oxydation totale de l'acide L-lactique est la même que celle de l'acide D-lactique. La méthode de calcul exposée au paragraphe II-A-1°) reste valable ; elle a permis d'obtenir les rapports entre absorption réelle d'oxygène et absorption théorique (tabl. 30).

TABLEAU 30

Bilan de l'oxydation de l'acide L-lactique

Génotype	Souche	Zone de concentration étudiée (mμ mol par cupule)	Nombre d'expériences	Nombre de déterminations	Bilan moyen de l'oxydation
PL/PL	4	342 à 1710	2	10	0,77
pl_1/pl_1	32	342 à 1710	2	10	0,89
pl_5/pl_5	183	342 à 1710	3	15	0,88

Le bilan des oxydations est exprimé par le rapport entre l'absorption réelle d'oxygène et l'absorption théorique qui correspondrait à une oxydation totale de l'acide L-lactique ; la valeur indiquée représente la moyenne de plusieurs déterminations. Dans chaque expérience, le rendement a été déterminé pour 5 concentrations différentes.

Je n'ai pas observé de différence entre les souches sauvages (n° 4) et les souches colonies lisses (n° 183 et 32). La levure oxyde environ 84 p. 100 de l'acide L-lactique en gaz carbonique et en eau, et incorpore le reste dans des synthèses. En définitive, les bilans d'oxydation des acides L et D-lactiques sont pratiquement identiques. C'est ce qui explique que Tore Levring ait trouvé des résultats analogues en utilisant un mélange des deux isomères. Ce résultat semble indiquer que les acides L et D-lactiques empruntent les mêmes voies métaboliques bien que les enzymes responsables de leurs déshydrogénations soient différents.

Notons enfin que le quotient respiratoire de l'acide L-lactique est voisin de 1. La moyenne de 9 déterminations a donné pour le quotient respiratoire 0,95. Les remarques effectuées dans le cas de l'acide D-lactique demeurent valables ici.

c) *Étude de l'acide pyruvique*

L'acide pyruvique a été étudié dans les mêmes conditions que les acides L et D-lactiques ; la consommation est totale en 2 heures et le Q_{O_2} pyruvate devient égal au Q_{O_2} endogène la dernière demi-heure pour toutes les expériences. A titre d'illustration, j'ai représenté pour une expérience l'absorption totale d'oxygène par cupule en fonction du temps en présence des concentrations extrêmes d'acide pyruvique et en absence de substrat (graph. 8A) ; les concentrations utilisées sont limitantes

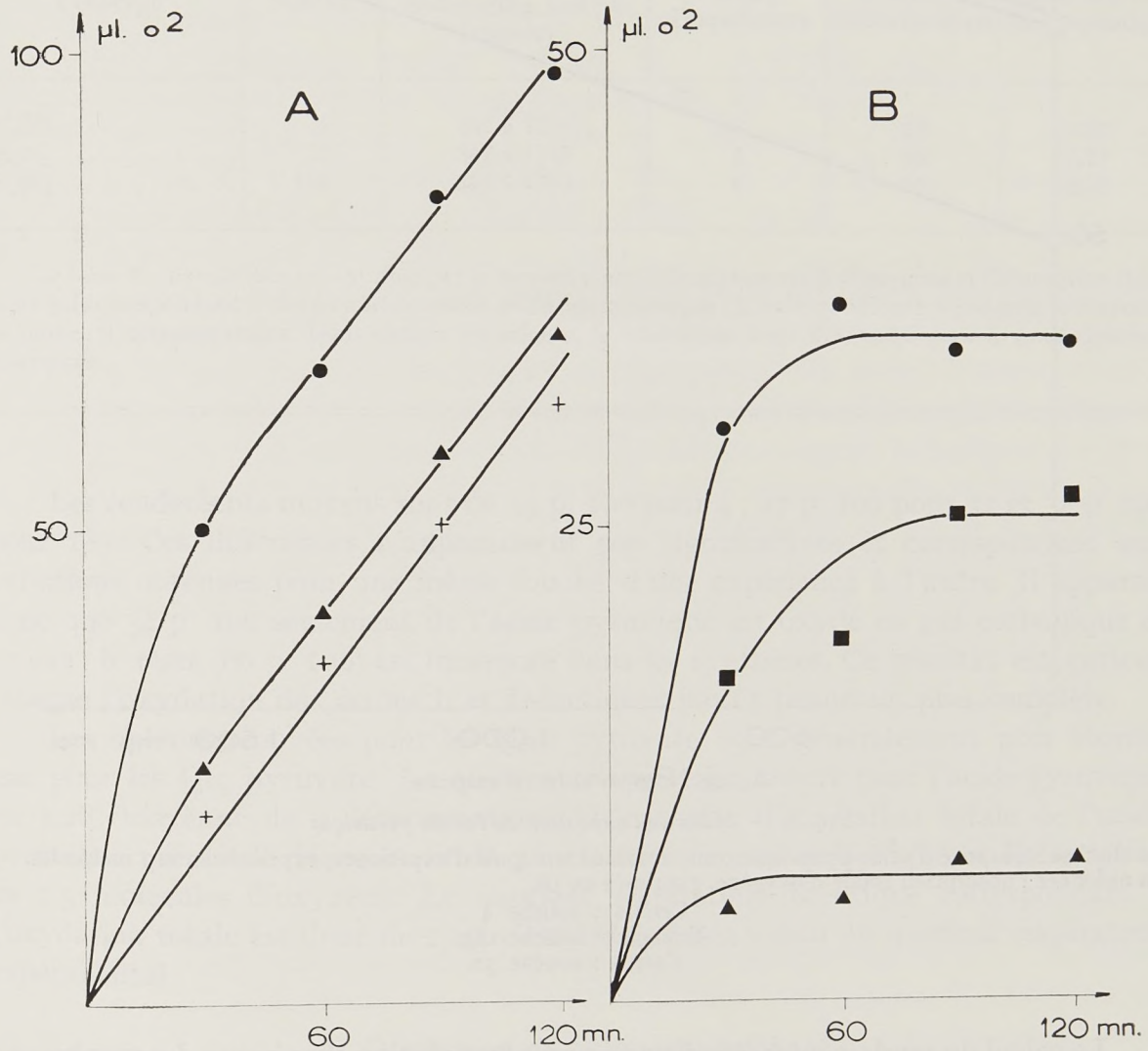


FIG. 8. — *Utilisation d'une quantité limitante d'acide pyruvique*
Souche n°4

En abscisse : temps, exprimé en minutes.
En ordonnée : absorption d'oxygène, exprimée en µl.
A — Absorption totale d'oxygène dans une cupule, en fonction du temps.
Cercles : avec 1 710 mµ molécules d'acide pyruvique dans la cupule.
Triangles : avec 342 mµ molécules.
Croix : en l'absence de substrat.
B — Absorption d'oxygène, corrigée pour l'activité endogène, dans une cupule en fonction du temps
Cercles : avec 1 710 mµ molécules d'acide pyruvique dans la cupule.
Carrés : avec 1 026 mµ molécules.
Triangles : avec 342 mµ molécules.

dans nos conditions d'expérience puisque la vitesse d'absorption de l'oxygène diminue en fonction du temps. Pour la même expérience, le graphique 8B représente l'absorption totale d'oxygène corrigée de l'absorption en l'absence de substrat en fonction du temps ; l'oxydation de l'acide pyruvique est terminée en deux heures.

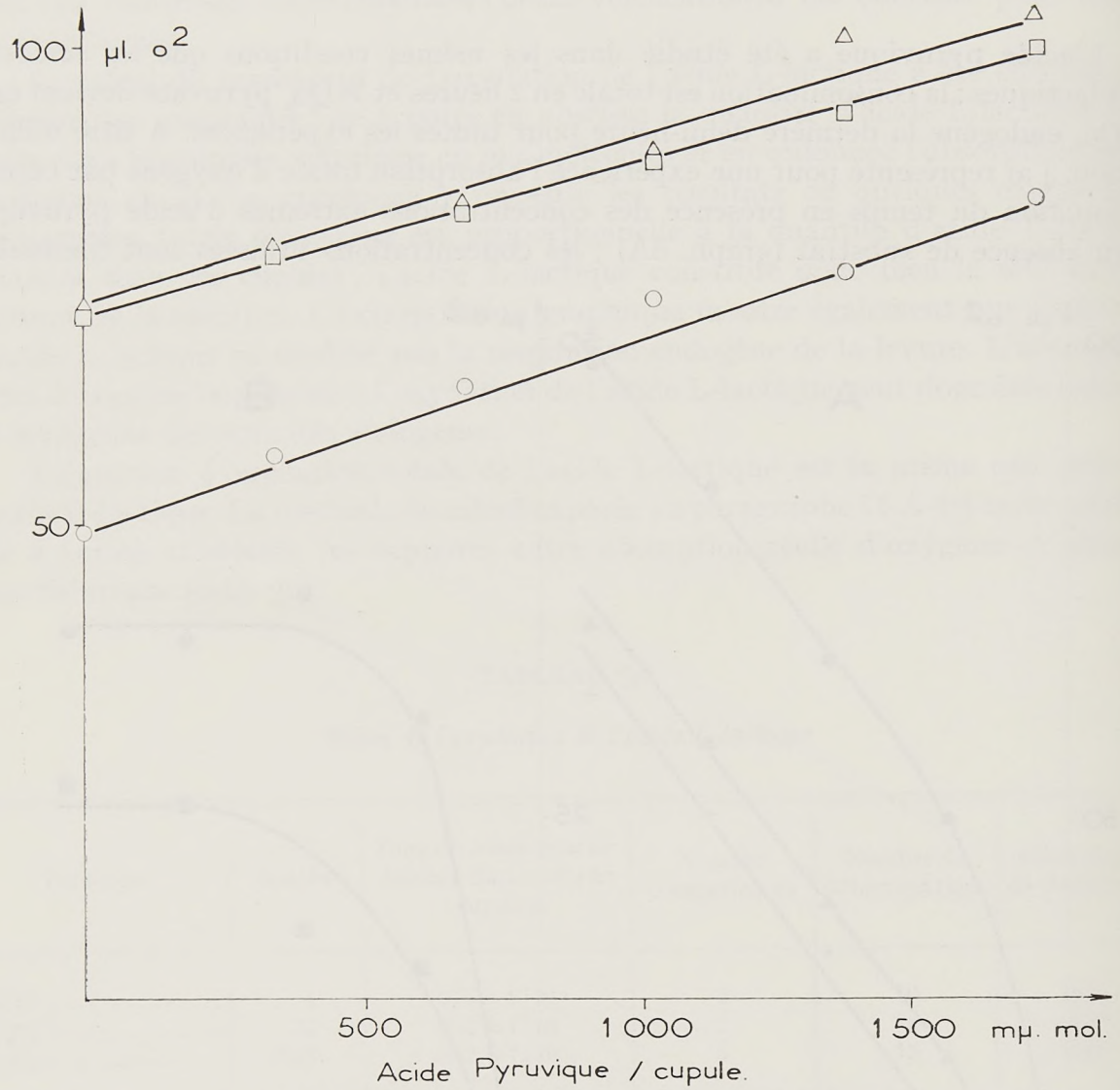


FIG. 9. — *Bilan de l'oxydation de l'acide pyruvique*

En abscisse : quantité d'acide pyruvique contenue dans la cupule d'expérience, exprimée en mµ molécules.
En ordonnée : absorption totale d'oxygène, exprimée en µl.

Cercles : souche 4
Triangles : souche 183
Carrés : souche 32.

Le calcul du rendement a été effectué par intrapolation graphique. Le graphique 9 indique à titre d'exemple les résultats obtenus dans 3 cas. L'acide pyruvique est bien le seul facteur limitant de la réaction. L'extrapolation au zéro montre que l'addition d'acide pyruvique ne modifie pas la respiration endogène. Il est donc correct d'enlever de l'absorption brute d'oxygène l'activité endogène afin de déterminer l'absorption réelle d'oxygène correspondant à l'oxydation de l'acide pyruvique.

L'oxydation totale de l'acide pyruvique s'effectue suivant la réaction :

$$CH_3CO\ COOH + 5/2\ O_2 \rightarrow 3CO_2 + 2H_2O.$$

L'oxydation totale d'une molécule d'acide pyruvique, consomme donc 56 litres d'oxygène. Le bilan de l'oxydation s'exprime par le rapport entre l'absorption réelle d'oxygène et l'absorption théorique correspondant à l'oxydation totale de l'acide pyruvique placé au contact de la levure. Les résultats donnés par la souche sauvage n° 4 et par les souches mutantes n° 32 et 183, sont reproduits au tableau 31.

TABLEAU 31

Bilan de l'oxydation de l'acide pyruvique

Génotype	Souche	Zone de concentration étudiée (mμ mol par cupule)	Nombre d'expériences	Nombre de déterminations	Bilan moyen de l'oxydation
PL/PL	4	342 à 1710	4	20	0,39
pl_1/pl_1	32	342 à 1710	2	10	0,27
pl_5/pl_5	183	342 à 1710	2	10	0,32

Le bilan des oxydations est exprimé par le rapport entre l'absorption réelle d'oxygène et l'absorption théorique qui correspondrait à une oxydation totale de l'acide pyruvique ; la valeur indiquée représente la moyenne de plusieurs déterminations. Dans chaque expérience, le rendement a été déterminé pour 5 concentrations différentes.

Les rendements moyens sont de 39 p. 100 pour 4 ; 27 p. 100 pour 32 et 32 p. 100 pour 183. Ces différences n'apparaissent pas significatives et correspondent aux variations obtenues pour une même souche d'une expérience à l'autre. Il apparaît donc que 34 p. 100 seulement de l'acide pyruvique est oxydé en gaz carbonique et en eau ; le reste (66 p. 100) est incorporé dans les synthèses. Ce résultat est curieux puisque l'oxydation des acides L et D-lactiques paraît beaucoup plus complète.

Les valeurs trouvées pour les Q_{CO^2} pyruvate sont généralement plus élevées que pour les Q_{O_2} pyruvate. Le quotient respiratoire trouvé pour l'acide pyruvique est 1,28 (moyenne de 9 déterminations). L'équation d'oxydation totale de l'acide pyruvique prévoit le dégagement de 3 molécules de gaz carbonique et l'absorption de 2,5 molécules d'oxygène. Le quotient respiratoire théorique correspondant à l'oxydation totale est donc de 1,20, c'est-à-dire assez voisin du quotient respiratoire expérimental.

d) *Discussion du sous-paragraphe* A

Les souches 4, 32 et 183 ne diffèrent pas entre elles pour les bilans d'oxydation des acides pyruvique, L et D-lactiques. La mutation colonie lisse ne modifie pas les bilans d'oxydation de ces substrats ni leur incorporation dans les réserves.

Les acides L et D-lactiques sont très fortement oxydés : 85 p. 100 pour l'acide L-lactique et 80 p. 100 pour l'acide D-lactique. Ces valeurs représentent des moyennes et sont remarquablement voisines ; elles suggèrent que les assimilations des acides L et D-lactiques pourraient s'effectuer par les mêmes voies métaboliques.

L'assimilation de l'acide pyruvique est beaucoup plus importante, puisque le rendement de l'oxydation n'est en moyenne que de 34 p. 100. Or, la transformation de l'acide lactique en acide pyruvique n'absorbe que 17 p. 100 de l'oxygène nécessaire à l'oxydation totale de l'acide lactique. Une oxydation à 80 p. 100 de l'acide lactique exige donc que l'acide pyruvique formé soit oxydé à 76 p. 100. L'acide pyruvique d'origine endogène formé par action des lacticodéshydrogénases sur l'acide lactique a donc un rendement d'oxydation plus de deux fois plus élevé que l'acide pyruvique d'origine exogène. Cette remarque laisse supposer que les acides pyruviques exogène et endogène ne subissent pas le même contrôle métabolique.

Une première hypothèse se présente : ces deux voies métaboliques sont l'oxydase pyruvique pour l'acide d'origine endogène et la décarboxylase pyruvique pour l'acide d'origine exogène. En effet, l'oxydase pyruvique se trouve dans les mitochondries (Holzer, et Goedde, 1957) comme la D-lacticodéshydrogénase et elle est intégrée au système respiratoire. En outre, l'oxydase pyruvique a une grande affinité pour son substrat ; ces diverses raisons permettent de penser que l'acide pyruvique endogène est transformé en acétyl-CoA par cette enzyme. Dans l'hypothèse d'une décarboxylation de l'acide pyruvique exogène en acide acétique par la décarboxylase, 20 p. 100 de l'oxygène nécessaire à l'oxydation totale de l'acide pyruvique est absorbé par la seule formation d'acide acétique. D'autre part, Tore Levring, (1945) a montré que l'acide acétique était oxydé à 55 p. 100. Dans ces conditions, le bilan de l'oxydation de l'acide pyruvique devrait donner 64 p. 100 d'acide oxydé et 36 p. 100 d'acide intégré dans les synthèses ; ce n'est pas le cas.

En définitive, il semble improbable que les voies d'oxydation des acides pyruviques endogène et exogène, soient différentes ; en tout état de cause, l'acétyl-CoA formé doit être métabolisé par le cycle de Krebs. Les valeurs trouvées pour le bilan d'oxydation de l'acide pyruvique ne peuvent s'expliquer par la seule intervention de la décarboxylase à la place de l'oxydase pyruvique. Il est possible que la différence entre les acides pyruviques endogène et exogène, provienne de l'incorporation de ce dernier dans les réserves avant décarboxylation.

Enfin, les quotients respiratoires expérimentaux sont assez voisins des valeurs théoriques prévues en fonction de l'équation d'oxydation totale aussi bien pour l'acide pyruvique que pour les acides L et D-lactiques. Cependant, il faut remarquer que les quotients respiratoires expérimentaux sont légèrement inférieurs aux quotients respiratoires théoriques pour les acides L et D-lactiques et légèrement supérieurs pour l'acide pyruvique.

Pour les deux acides lactiques, l'incorporation dans les synthèses est faible, inférieure à 20 p. 100 ; l'acide lactique présente le même équilibre C-H-O, donc le même quotient respiratoire, que les glucides. Il n'est pas étonnant que le QR des deux acides lactiques soit pratiquement égal au coefficient théorique, puisque, d'une part, l'oxydation est presque totale et que, d'autre part, l'incorporation dans les glucides ne peut apporter aucune modification.

En ce qui concerne l'acide pyruvique par contre, l'incorporation dans les réserves est très importante (66 p. 100) et devrait marquer sur le QR.

Van Niel et Cohen (1942) ont trouvé chez *Candida albicans* un quotient respiratoire expérimental pour l'acide pyruvique (1,33) plus élevé que le quotient théorique (1,20) ; cette observation est conforme à mes résultats. L'acide pyruvique présente un quotient respiratoire théorique supérieur à l'unité car il est riche en

oxygène ; son incorporation dans les glucides implique un processus réducteur. L'absorption d'oxygène est donc inférieure à celle prévue pour une oxydation totale et le quotient respiratoire expérimental est plus élevé que le quotient théorique.

Les quotients respiratoires expérimentaux trouvés pour l'éthanol (0,35) et l'éthanal (0,69) sont nettement inférieurs aux quotients théoriques correspondant à l'oxydation totale chez *Saccharomyces cerevisiae* (INGRAM 1955).

L'incorporation dans les synthèses glucidiques de l'éthanol ou de l'éthanal exige une absorption importante d'oxygène ; il en résulte donc une baisse importante du quotient respiratoire. L'ensemble de ces données paraît compatible avec l'hypothèse d'une incorporation dans des synthèses à prédominance glucidique.

De toute façon, une incorporation importante dans les lipides paraît exclue car cette hypothèse impliquerait des quotients respiratoires beaucoup plus élevés.

B. — VITESSE DE LA RESPIRATION

a) *Étude de la levure cultivée sur glucose*

La levure cultivée sur milieu synthétique à base de glucose à 25° avec agitation est étudiée en fin de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire (population 50 à 90 millions de cellules par ml). Cette phase de la croissance correspond à celle où les variations de la vitesse de respiration sont les plus élevées. En effet, la levure présente une vitesse de respiration minimum pendant la phase exponentielle de croissance et une vitesse maximum au début de la phase stationnaire (SLONIMSKI, 1959) ; j'ai pris la levure pendant le passage de la 1re à la 2e phase. J'ai effectué un grand nombre de mesures pour compenser l'effet que ces variations pourraient avoir sur les vitesses moyennes déterminées (cf. chapitre I, § III, B).

La vitesse de respiration du glucose est mesurée dans l'appareil de Warburg en présence d'une concentration finale de 1 p. 100 ; celles des acide pyruvique, L-lactique et D-lactique sont mesurées pour une concentration finale de 38 mM. Les vitesses de respiration de ces divers substrats ont été suivies pendant 2 heures. La figure 10 donne la consommation totale d'oxygène en fonction du temps exprimée en µl d'oxygène absorbé par mg de matière sèche. L'expérience représentée sur ce graphique concerne la souche 4 mais les résultats sont du même ordre pour les autres souches. Il apparaît nettement que l'absorption d'oxygène est proportionnelle au temps pour les quatre substrats ; ce qui revient à dire que la vitesse de la respiration est sensiblement constante pendant 2 heures et qu'il n'y a pas épuisement du substrat.

La vitesse de respiration de l'acide D-lactique est de 60 µl/heure/mg m. s. en moyenne ; le rendement de son oxydation est de 80 p. 100. Dans une cupule contenant 1 mg de matière sèche, la consommation d'acide D-lactique en 2 heures est donc environ de 2,5 µ molécules d'après l'équation d'oxydation complète de l'acide lactique (cf. § II-A-1°). L'acide D-lactique consommé par la levure au cours de la mesure est donc négligeable en regard de ce qui reste dans la cupule après deux heures soit environ 66 µmolécules. Cette remarque est à fortiori valable pour l'acide L-lactique qui est consommé moins rapidement par la levure que l'acide D-lactique comme nous le

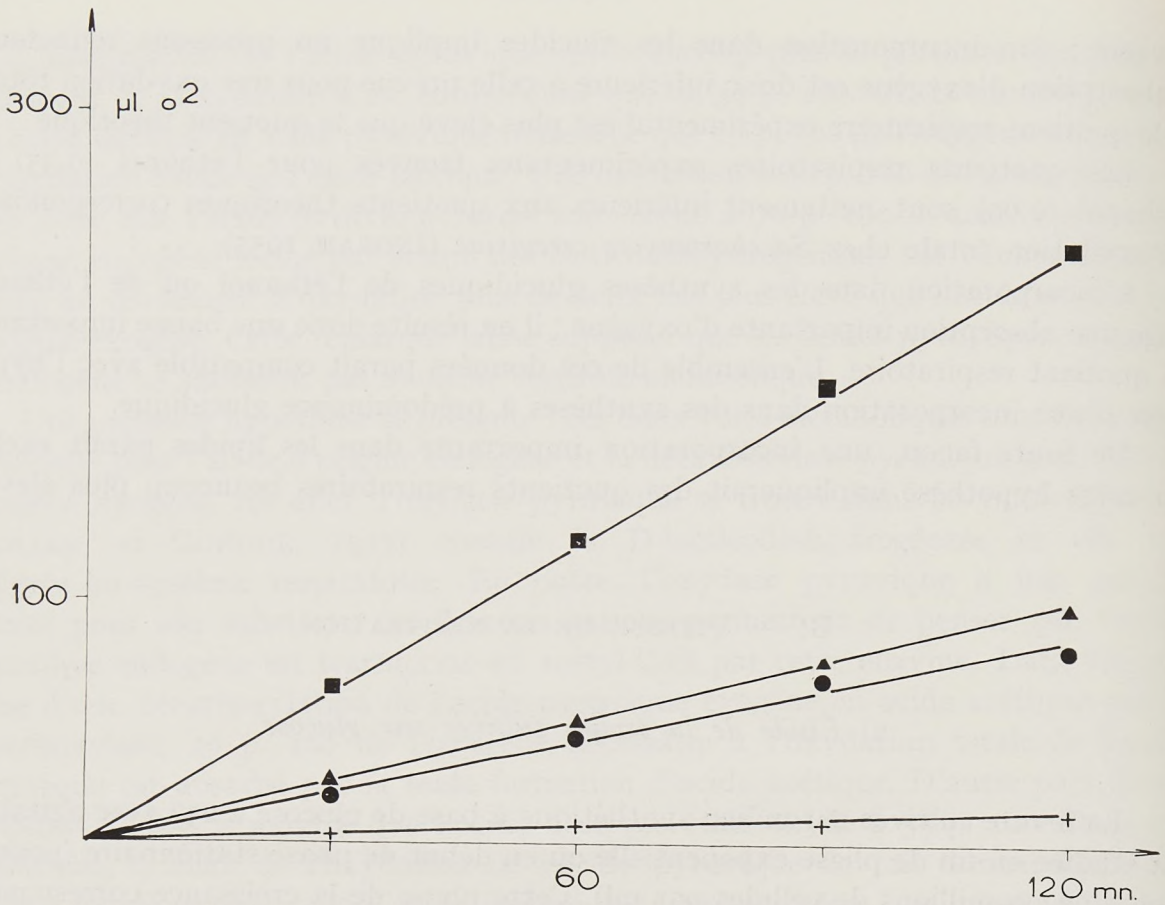


FIG. 10. — *Absorption totale d'oxygène en fonction du temps en présence de différents substrats*

Souche n° 4 — Levure cultivée sur glucose

En abscisse : Temps exprimé en minutes.

En ordonnée : oxygène total absorbé par 1 mg de matière sèche, exprimé en µl.

Croix : absence de substrat
Carrés : glucose 280 mM.
Triangles : acide L-lactique 38 mM.
Cercles : acide D-lactique 38 mM.

L'acide pyruvique 38 mM n'est pas représenté. Les valeurs ont été trouvées identiques à celles de l'acide D-lactique.

TABLEAU 32

Vitesse de respiration de divers substrats par les différentes souches de levures cultivées sur glucose

Souche	Génotype	Respiration endogène	Acide L-lactique	Acide D-lactique	Acide pyruvique	Glucose
4	PL_1/PL_1 PL_5/PL_5	10 (N = 46)	48 (N = 31)	59 (N = 30)	59 (N = 19)	103 (N = 13)
183	pl_1/pl_1 PL_5/PL_5	11 (N = 47)	46 (N = 34)	60 (N = 32)	60 (N = 20)	97 (N = 15)
32	PL_1/PL_1 pl_5/pl_5	10 (N = 25)	43 (N = 21)	62 (N = 21)	61 (N = 20)	85 (N = 8)

Les vitesses de respiration sont exprimées en µl d'oxygène absorbés par 1 mg de matière sèche à l'heure ; elles sont calculées entre 0 et 30 m (lecture pour temps zéro : 5 m après l'addition du substrat).

Les valeurs données dans le tableau représentent les moyennes de N déterminations ; le nombre N de déterminations est indiqué chaque fois entre parenthèses à côté de la vitesse moyenne de respiration.

verrons dans ce paragraphe. L'acide pyruvique présente au contraire une vitesse de respiration de l'ordre de 60 µl/heure/mg m. s. et un rendement d'oxydation faible : 34 p. 100 (cf. § II-A-3). En fonction de ces deux valeurs, la consommation d'acide pyruvique pour 1 mg de matière sèche de levure peut s'estimer à 6,5 µ molécules en 2 heures d'après l'équation d'oxydation complète de l'acide pyruvique. La quantité d'acide pyruvique consommée au cours de la mesure est également négligeable et ne modifie pratiquement pas la concentration en substrat.

Les vitesses de respiration ont été calculées entre 0 et 30 mn et sont exprimées en µl d'oxygène absorbés par mg de matière sèche et par heure. Le tableau 32 indique la moyenne des résultats obtenus pour les divers substrats ainsi que le nombre de déterminations ayant servi au calcul de la moyenne.

Une première remarque s'impose : les vitesses de respiration des trois souches 4, 183 et 32 sur les quatre substrats sont remarquablement voisines. La mutation « colonie lisse » n'a pas modifié la vitesse de la respiration pour la levure cultivée sur glucose. D'autre part, il apparaît que le glucose est le substrat le plus rapidement respiré aussi bien par la levure sauvage que par les mutants : $Q_{O_2} = 103$ pour la souche 4 ; $Q_{O_2} = 97$ pour 183 ; $Q_{O_2} = 85$ pour 32.

La respiration des acides D-lactique et pyruvique est nettement moins rapide. J'ai trouvé pour l'acide D-lactique :

$Q_{O_2} = 59$ pour la souche 4
$Q_{O_2} = 60$ pour la souche 183
$Q_{O_2} = 62$ pour la souche 32.

Les vitesses de respiration sont très voisines pour l'acide pyruvique :

$Q_{O_2} = 59$ pour la souche 4
$Q_{O_2} = 60$ pour la souche 183
$Q_{O_2} = 61$ pour la souche 32.

La respiration de l'acide L-lactique est beaucoup plus lente :

$Q_{O_2} = 48$ pour la souche 4
$Q_{O_2} = 46$ pour la souche 183
$Q_{O_2} = 43$ pour la souche 32.

La respiration endogène est identique pour les 3 souches :

$Q_{O_2} = 10$ pour les souches 4 et 32
et $Q_{O_2} = 11$ pour la souche 183.

J'ai également suivi l'évolution de la vitesse de respiration en fonction du temps pendant 2 heures ; (tabl. 33) les vitesses de respiration ont été calculées de trente en trente minutes :

0-30 m ; 30-60 m ; 60-90 m ; 90-120 m.

Toutes les vitesses sont exprimées en pourcentage de la vitesse de respiration de la levure sur glucose entre 0 et 2 heures. Cette vitesse de respiration du glucose est pratiquement constante pendant 2 heures. Tous les calculs ont été con-

duits en utilisant les vitesses de respiration corrigées de l'activité endogène. Chaque valeur fournie dans le tableau 33 représente la moyenne de 4 expériences.

La représentation des résultats obtenus pour l'acide D-lactique (fig. 11A) montre que la vitesse de respiration de ce substrat est stable. Cependant, j'ai observé systématiquement une baisse passagère au cours de la 2e demi-heure. Les résultats obtenus pour les trois souches 4, 183 et 32 sont comparables ; ce mode de représentation met nettement en évidence le fait que la vitesse de respiration de l'acide D-lactique est nettement inférieure à celle du glucose. La vitesse de respiration de l'acide L-lactique (fig. 11-B) est stable pour la souche 4 ; cette vitesse a augmenté légèrement en deux heures pour les souches 32 et 183 mais il n'est pas certain que cette augmentation soit significative.

TABLEAU 33

Vitesses relatives de respiration rapportées au glucose. Levures cultivées sur glucose

Souche	Génotype	Acide L-lactique	Acide D-lactique	Acide pyruvique
4	PL_1/PL_1 PL_5/PL_5	39-40-39-39	43-35-40-43	49-48-40-35
183	pl_1/pl_1 PL_5/PL_5	41-41-46-48	48-41-50-51	60-64-61-55
32	PL_1/PL_1 pl_5/pl_5	41-45-51-52	56-45-54-55	61-70-67-61

Les vitesses de respiration ont été calculées de trente en trente minutes ; elles ont été ensuite exprimées en pourcentage de la vitesse de respiration du glucose calculée entre 0 et 2 heures. Les nombres figurant dans le tableau pour une souche et un substrat déterminés représentent donc des vitesses relatives de respiration rapportées au glucose ; nous avons donné dans l'ordre des valeurs pour 0-30 m ; 30-60 m ; 60-90 m ; 90-120 m.

Chaque nombre figurant dans le tableau représente la moyenne de 4 expériences. Tous les calculs ont été effectués avec les vitesses nettes corrigées pour la respiration endogène.

Enfin la vitesse de respiration de l'acide pyruvique (fig. 11C) baisse en deux heures pour toutes les souches. Cette baisse légère de la vitesse de respiration de l'acide pyruvique ne peut pas s'expliquer par une diminution de la concentration en acide pyruvique en cours d'expérience.

Aucune différence fondamentale n'a été mise en évidence entre les souches sauvages et mutantes pour les vitesses de respiration des acides pyruvique, L et D-lactiques lorsque la levure est cultivée sur milieu glucosé. Il convient d'étudier maintenant s'il en est ainsi pour les levures cultivées sur acide lactique.

b) *Étude de la levure cultivée sur acide D,L-lactique*

Les mêmes souches de levures ont été étudiées après culture sur milieu synthétique à base d'acide D,L-lactique (G lactate). Les conditions de culture et d'expérience étaient identiques à celles décrites pour l'étude de la levure cultivée sur glucose.

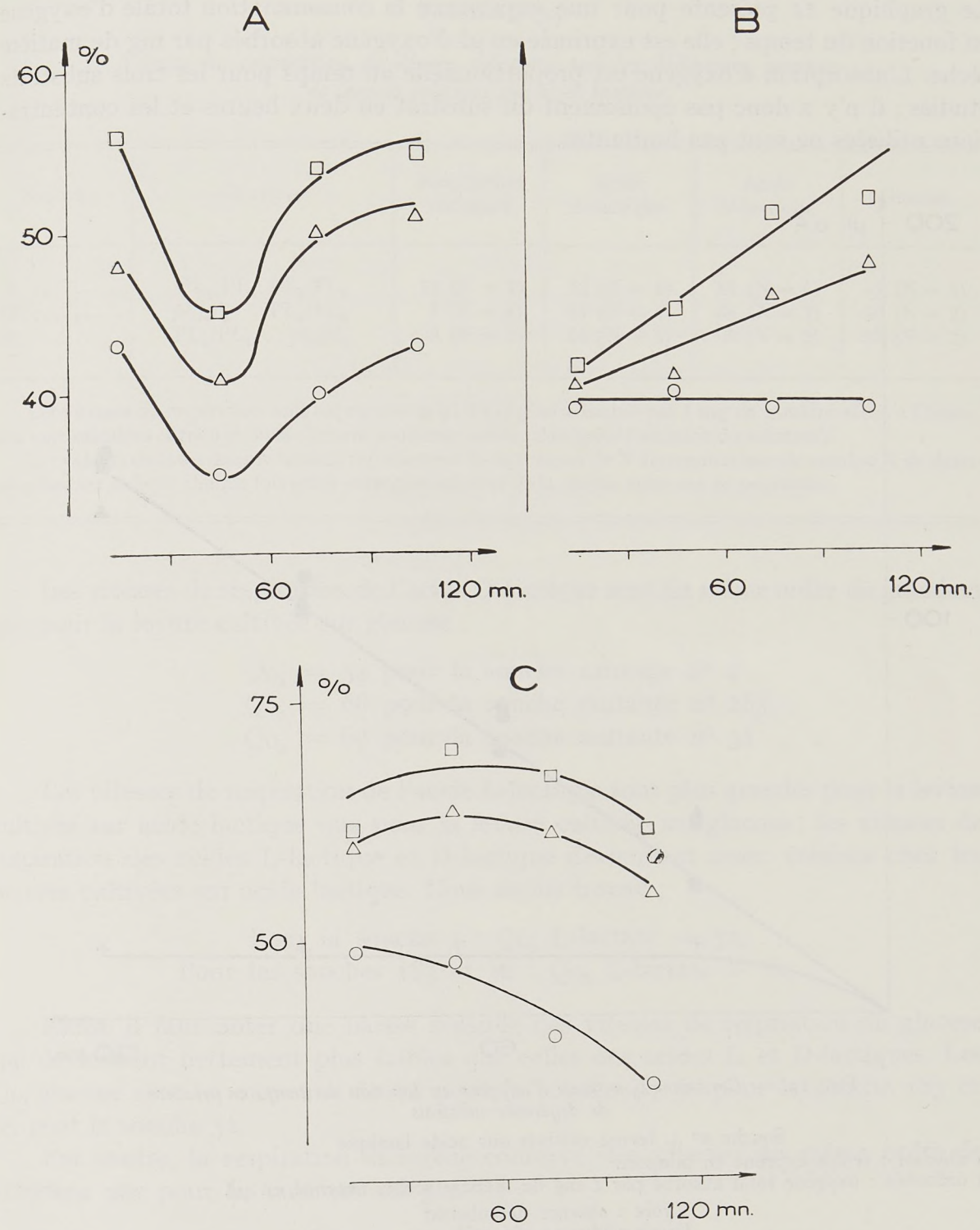


FIG. 11. — *Vitesse relative de respiration de la levure cultivée sur glucose*
Évolution des Q_{O_2} au cours de la mesure

En abscisse : temps exprimé en minutes.
En ordonnée : vitesses de respiration calculées de 30 en 30 minutes et rapportées à la vitesse de respiration du glucose entre 0 et 2 heures.

A — Acide D-lactique
B — Acide L-lactique
C — Acide pyruvique

Cercles : souche 4
Triangles : souche 183
Carrés : souche 32.

Le graphique 12 présente pour une expérience la consommation totale d'oxygène en fonction du temps ; elle est exprimée en µl d'oxygène absorbés par mg de matière sèche. L'absorption d'oxygène est proportionnelle au temps pour les trois substrats étudiés ; il n'y a donc pas épuisement du substrat en deux heures et les concentrations utilisées ne sont pas limitantes.

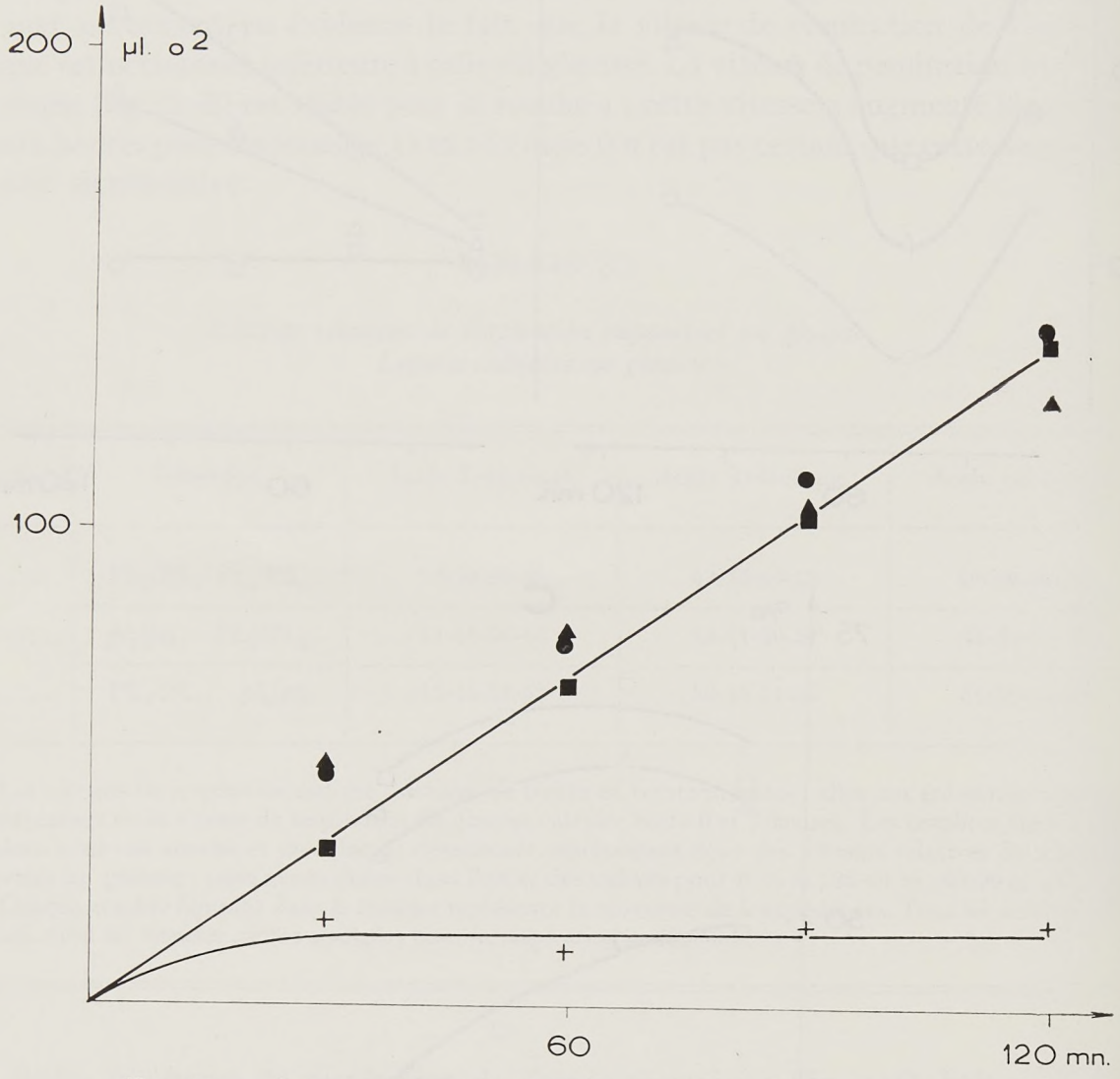


FIG. 12. — *Consommation totale d'oxygène en fonction du temps en présence de différents substrats*

Souche n° 4, levure cultivée sur acide lactique
En abscisse : temps exprimé en minutes.
En ordonnée : oxygène total absorbé par 1 mg de matière sèche, exprimé en µl.
Croix : absence de substrat
Carrés : glucose 280 mM.
Triangles : acide L-lactique 38 mM.
Cercles : acide D-lactique 38 mM.

Les vitesses de respiration, calculées entre 0 et 30 m, exprimées en µl d'oxygène absorbés par mg de matière sèche et par heure, sont indiquées dans le tableau 34. Les valeurs données dans ce tableau représentent les moyennes de plusieurs expériences. Il apparaît tout d'abord que les différences observées entre les souches sauvage et mutantes sont peu importantes et ne peuvent être considérées comme significatives.

TABLEAU 34

Vitesse de respiration de divers substrats par les différentes souches de levures cultivées sur acide lactique

Souche	Génotype	Respiration endogène	Acide L-lactique	Acide D-lactique	Glucose
4	PL_1/PL_1 PL_5/PL_5	12 (N = 2)	52 (N = 4)	54 (N = 4)	41 (N = 4)
183	pl_1/pl_1 PL_5/PL_5	7 (N = 4)	64 (N = 2)	66 (N = 2)	50 (N = 2)
32	PL_1/PL_1 pl_5/pl_5	9 (N = 3)	64 (N = 3)	69 (N = 2)	55 (N = 2)

Les vitesses de respiration sont exprimées en µl d'oxygène absorbés par 1 mg de matière sèche à l'heure ; elles sont calculées entre 0 et 30 m (lecture pour temps zéro : 5 m après l'addition du substrat).

Les valeurs données dans le tableau représentent les moyennes de N déterminations ; le nombre N de déterminations est indiqué chaque fois entre parenthèses à côté de la vitesse moyenne de respiration.

Les vitesses de respiration de l'acide D-lactique sont du même ordre de grandeur que pour la levure cultivée sur glucose :

Q_{O_2} = 54 pour la souche sauvage n° 4
Q_{O_2} = 66 pour la souche mutante n° 183
Q_{O_2} = 69 pour la souche mutante n° 32

Les vitesses de respiration de l'acide L-lactique sont plus grandes pour la levure cultivée sur acide lactique que pour la levure cultivée sur glucose ; les vitesses de respiration des acides L-lactique et D-lactique deviennent assez voisines chez les levures cultivées sur acide lactique. Nous avons trouvé :

Pour la souche 4 : Q_{O_2} L-lactate = 52,
Pour les souches 183 et 32 : Q_{O_2} L-lactate = 64.

Enfin, il faut noter une baisse sensible des vitesses de respiration du glucose qui deviennent nettement plus faibles que celles des acides L et D-lactiques. Les Q_{O_2} glucose sont en moyenne de 41 pour la souche 4 ; 50 pour la souche 183 et 55 pour la souche 32.

Par contre, la respiration endogène conserve des vitesses du même ordre de grandeur que pour les cultures sur glucose :

Q_{O_2} = 12 pour la souche 4,
Q_{O_2} = 7 pour la souche 183,
Q_{O_2} = 9 pour la souche 32.

En fait, il est difficile de comparer les valeurs absolues des vitesses de respiration de la levure cultivée sur glucose ou cultivée sur acide lactique. Dans le premier cas, la vitesse de respiration est minimum pendant la phase de croissance exponentielle et maximum en début de phase stationnaire (SLONIMSKI, 1959) ; au contraire, nous avons vu que dans les cultures sur acide lactique la vitesse de respiration croît pendant la phase de croissance exponentielle et devient maximum pendant cette

même phase pour ensuite baisser brusquement en phase stationnaire (GALZY, et SLONIMSKI, 1957, *a*). Les levures se trouvent dans des conditions physiologiques très différentes bien que prélevées à des stades de la croissance assez comparables. Il apparaît cependant que les vitesses maxima obtenues pour la respiration sont comparables dans les cultures sur acide lactique ou sur glucose. Une différence importante est pourtant facile à mettre en évidence : les vitesses de respiration du glucose deviennent inférieures à celles des acides L et D-lactiques chez les levures cultivées sur acide lactique.

La comparaison des vitesses moyennes de respiration des divers substrats est plus facile à réaliser que la comparaison des vitesses obtenues pour un substrat déterminé dans les cultures sur acide lactique ou sur glucose.

Une analyse précise de ce phénomène peut être réalisée en comparant les vitesses de respiration des différents substrats mesurées pour une même suspension cellulaire. C'est avec des résultats de ce type que nous avons calculé les données des tableaux 34 et 35.

J'ai suivi l'évolution de la vitesse de respiration en fonction du temps, pendant 2 heures, en calculant de trente en trente minutes et en corrigeant de l'activité endogène. Toutes les vitesses sont exprimées en pourcentage de la vitesse de respiration de la levure sur glucose calculée entre 0 et 2 h. (tabl. 35).

TABLEAU 35

Vitesses relatives de respiration rapportées au glucose.
Levures cultivées sur acide lactique

Souche	Génotype	Acide L-lactique	Acide D-lactique
4	PL_1/PL_1 PL_5/PL_5	95-87-68-66	100-102-94-92
183	pl_1/pl_1 PL_5/PL_5	118-99-85-79	121-105-102-104
32	PL_1/PL_1 pl_5/pl_5	108-95-80-73	119-119-111-113

Les vitesses de respiration ont été calculées de trente en trente minutes ; elles ont été ensuite exprimées en pourcentage de la vitesse de respiration du glucose calculée entre 0 et 2 heures. Les nombres figurant dans le tableau pour une souche et un substrat déterminés représentent donc des vitesses relatives de respiration rapportées au glucose ; nous avons donné dans l'ordre des valeurs pour 0-30 m ; 30-60 m ; 60-90 m ; 90-120 m.

Chaque nombre figurant dans le tableau représente la moyenne de 4 expériences. Tous les calculs ont été effectués avec les vitesses nettes corrigées pour la respiration endogène

Les résultats ont été représentés pour l'acide D-lactique sur le graphique 13A. La vitesse de respiration de l'acide D-lactique baisse légèrement en 2 heures. Dans le cas de l'acide L-lactique (graph. 13B) la baisse observée est beaucoup plus forte. Une diminution de la concentration en substrat en cours d'expérience est exclue et il est permis de penser que le système enzymatique responsable de la respiration de l'acide L-lactique baisse d'activité progressivement dans nos conditions de mesure.

Une différence semble apparaître dans le tableau 35 entre la souche sauvage n° 4 et les souches mutantes n° 32 et 183. Pour la souche sauvage, les vitesses de

respiration mesurées entre 0 et 30 m des acides D-lactique, L-lactique et du glucose sont voisines. Pour les souches mutantes, au contraire, les vitesses de respiration des acides L et D-lactiques sont nettement plus élevées que la vitesse de respiration du glucose pendant les trente premières minutes de mesure.

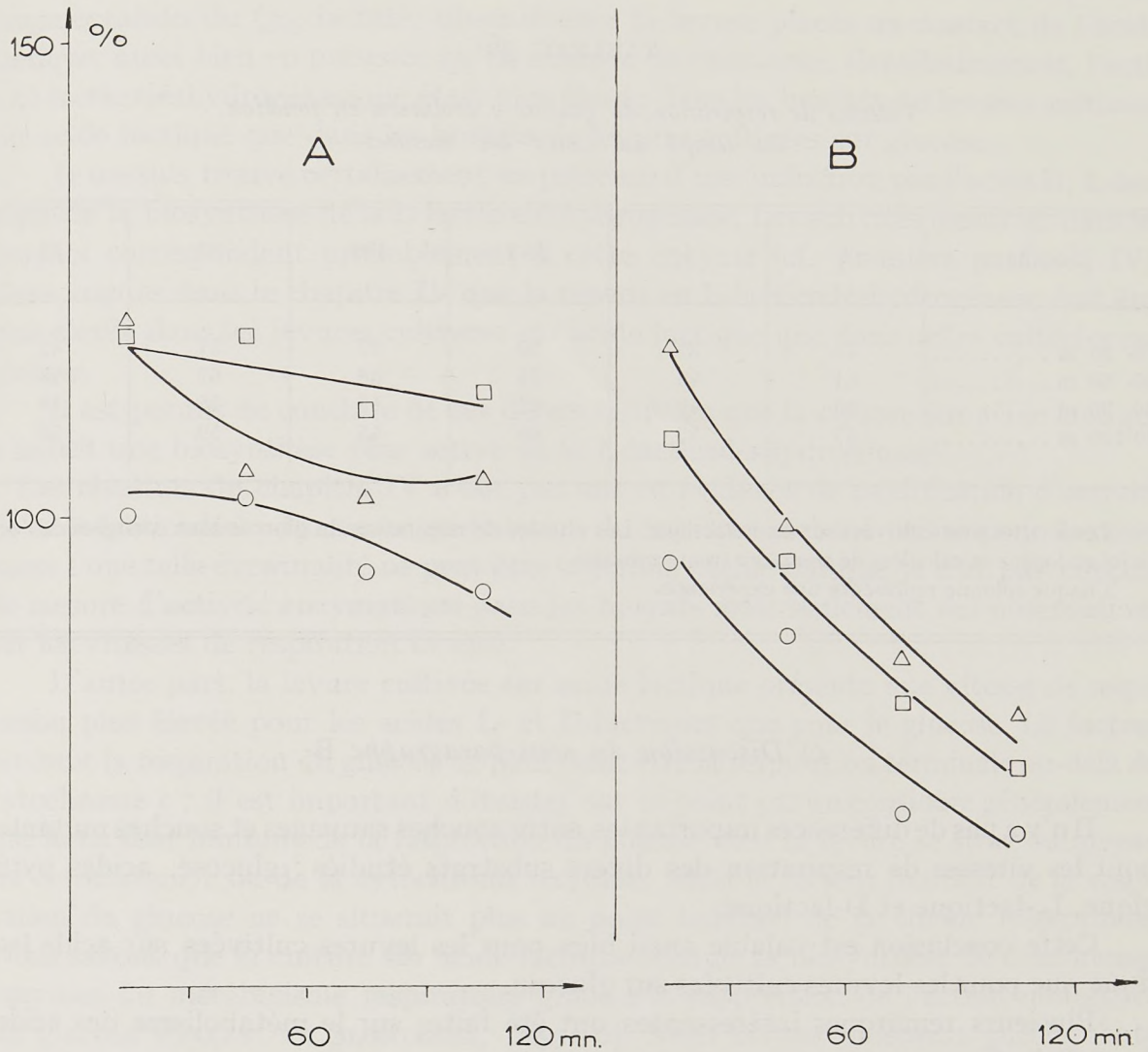


FIG. 13. — *Vitesse relative de respiration de la levure cultivée sur acide lactique*
Évolution des Q_{O_2} au cours de la mesure

En abscisse : temps exprimé en minutes.

En ordonnée : vitesses de respiration calculées de 30 en 30 minutes et rapportées à la vitesse de respiration du glucose entre 0 et 2 heures.

A — Acide D-lactique
B — Acide L-lactique

Cercles : souche 4
Triangles : souche 183
Carrés : souche 32

En fait, cette différence n'est pas réelle et provient d'un artifice de calcul. Entre 0 et 30 m, la vitesse de respiration du glucose est inférieure à la vitesse de respiration des acides L-lactique et D-lactique pour toutes les souches (tabl. 34). Mais les vitesses de respiration des acides L-lactique et D-lactique diminuent au cours des mesures (fig. 13, tabl. 35) tandis que la vitesse de respiration du glucose augmente

(tabl. 36). La comparaison des vitesses de respiration des acides lactiques entre 0 et 30 m à la vitesse de respiration du glucose calculée entre 0 et 2 h. est donc artificielle. Ce mode de représentation était plus intéressant pour la levure cultivée sur glucose ; dans ce cas, la vitesse de respiration du glucose demeurait constante durant 2 heures.

TABLEAU 36

Vitesses de respiration du glucose : évolution en fonction du temps au cours des mesures

Souche	4	4	183	183	32	32
0- 30 m	48	35	50	37	51	42
30- 60 m	61	46	54	38	62	48
60- 90 m	59	49	62	43	55	49
90-120 m	67	52	60	45	59	50

Les levures sont cultivées sur acide lactique. Les vitesses de respiration du glucose sont corrigées de l'activité endogène et calculées de trente en trente minutes.

Chaque colonne représente une expérience.

c) *Discussion du sous-paragraphe* B

Il n'y a pas de différences importantes entre souches sauvages et souches mutantes pour les vitesses de respiration des divers substrats étudiés : glucose, acides pyruvique, L.-lactique et D-lactique.

Cette conclusion est valable aussi bien pour les levures cultivées sur acide lactique que pour les levures cultivées sur glucose.

Plusieurs remarques intéressantes ont été faites sur le métabolisme des acides L- et D-lactiques.

La levure cultivée sur glucose respire les acides L-lactique, D-lactique et pyruvique moins rapidement que le glucose ; le facteur limitant la respiration de ces trois substrats n'est donc pas la respiration terminale. Les vitesses observées pour les acides D-lactique et pyruvique sont généralement très voisines ; il parait donc probable que le facteur limitant la vitesse d'oxydation est commun à ces deux substrats. La vitesse de respiration de l'acide D-lactique n'est donc limitée ni par la D-lacticodéshydrogénase ni par la cytochrome oxydase mais par un chaînon commun au métabolisme des acides pyruvique et D-lactique. Par contre, la vitesse de respiration de l'acide L-lactique qui est toujours nettement plus faible que celle des acides pyruvique et D-lactique est nécessairement limitée par la seule enzyme qui lui soit spécifique : la L-lacticodéshydrogénase.

Les levures cultivées sur acide lactique ont un comportement nettement différent. Il faut noter tout d'abord que les vitesses de respiration des acides L et D-lactiques deviennent très voisines.

Il est utile de comparer ces résultats aux expériences préliminaires décrites dans le premier chapitre ; il convient de rappeler au préalable que les souches utilisées dans les deux cas ne sont pas les mêmes et que les expériences du premier chapitre ont été réalisées avec l'acide lactique du commerce.

Au cours de ce chapitre préliminaire, j'ai décrit un phénomène d'adaptation (augmentation du Q_{O_2} lactate) observé chez la levure placée au contact de l'acide lactique, aussi bien en présence qu'en absence de croissance. Corrélativement, l'activité lacticodéshydrogénasique était plus élevée dans les broyats de levures cultivées sur acide lactique que dans les broyats de levures cultivées sur glucose.

Je me suis trouvé certainement en présence d'une induction par l'acide D, L-lactique de la biosynthèse de la L-lacticodéshydrogénase. Les activités mesurées dans les broyats correspondent probablement à cette enzyme (cf. première partie, § IV). Nous voyons dans le chapitre IV que la teneur en L-lacticodéshydrogénase doit être plus élevée dans les levures cultivées sur acide lactique que dans celles cultivées sur glucose.

Il est permis de conclure de ces divers résultats que la culture sur acide lactique a induit une biosynthèse plus active de la L-lacticodéshydrogénase.

Les résultats du chapitre IV n'ont pas mis en évidence de modification d'activité de la D-lacticodéshydrogénase en fonction du substrat carboné utilisé pour la croissance ; une telle éventualité ne peut être toutefois exclue puisque je n'ai pas effectué de mesure d'activité enzymatique dans les broyats mais seulement des observations sur les vitesses de respiration *in vivo*.

D'autre part, la levure cultivée sur acide lactique présente une vitesse de respiration plus élevée pour les acides L- et D-lactiques que pour le glucose. Le facteur limitant la respiration du glucose ne peut donc être la respiration terminale au-delà du cytochrome *c* ; il est important d'insister sur ce point car on considère généralement que le facteur limitant de la respiration du glucose chez la levure se situe au niveau du cytochrome *c* ou de la cytochrome oxydase. Ainsi le facteur limitant de la respiration du glucose ne se situerait plus au point habituel de la chaîne respiratoire. Nous savons que la culture sur acide lactique stimule la biosynthèse de nombreuses enzymes du métabolisme respiratoire grâce à la suppression de l'action inhibitrice du glucose (Galzy, et Slonimski, 1957, b). Nous savons également que la chute de vitesse de respiration observable pendant la phase de croissance exponentielle sur glucose ne se produit pas dans les cultures sur acide lactique (Galzy, et Slonimski, 1957, *a*).

Bien que je n'ai pas fait de mesures dans les broyats, il est permis de penser que la levure cultivée sur acide lactique est plus riche en cytochrome oxydase que la levure cultivée sur glucose. Il n'est donc pas étonnant que le facteur limitant la respiration du glucose ne se trouve plus au même point de la chaîne respiratoire.

Rappelons qu'un résultat analogue a été trouvé dans le premier chapitre avec des souches différentes. La vitesse de respiration du glucose est plus faible que celle de l'acide lactique chez la levure cultivée sur acide lactique et nettement plus élevée chez la levure cultivée sur glucose (cf. fig. 3).

La culture de la levure sur acide lactique aurait donc deux effets : une biosynthèse plus active du système respiratoire général grâce à l'absence de l'inhibiteur glucose; une biosynthèse induite du système spécifique de sa propre oxydation (L-lacticodéshydrogénase).

Au cours d'une étude effectuée sur les levures de brasserie, J. Haboucha (1962) a mesuré les vitesses de respiration des levures cultivées sur glucose, sur éthanol ou sur acide acétique. Ses résultats montrent que le pouvoir respiratoire des levures de brasserie est nettement plus élevé après culture sur éthanol ou acide acétique qu'après culture sur glucose. Il apparaît également que les levures cultivées sur éthanol ou acide acétique respirent ces deux substrats beaucoup plus rapidement que le glucose.

Rappelons d'autre part que Wanderwinkel (1960) a mis en évidence l'induction de la biosynthèse des enzymes du shunt glyoxylique par culture de la levure sur acide acétique. L'activité de la succinodéshydrogénase est également plus élevée dans les cultures sur acide acétique que dans les cultures sur glucose. Il est possible que les observations que nous avons faites au sujet de la levure cultivée sur acide lactique aient une valeur plus générale.

La culture de la levure sur un substrat oxydable de nature non glucidique aurait deux effets : une biosynthèse plus active du système respiratoire général grâce à l'absence de l'inhibiteur glucose ; une biosynthèse induite du système spécifique d'oxydation du substrat considéré.

Une telle situation est particulièrement intéressante. L'étude physiologique et enzymatique de la levure cultivée sur divers substrats non glucidiques fournirait une méthode d'étude simple de l'effet glucose. La comparaison du métabolisme de la levure sur ces divers substrats pourrait nous renseigner à la fois sur les mécanismes d'inhibition du métabolisme respiratoire par le glucose et sur le métabolisme des divers substrats étudiés.

III. — Étude de l'« affinité » du système respiratoire pour les acides lactiques et pyruvique *in vivo*

A. — Introduction

J'ai étudié au paragraphe précédent d'une part le bilan des oxydations des acides lactiques et pyruvique chez les différentes souches et, d'autre part, la cinétique de la respiration des mêmes acides en fonction du temps. J'ai constaté des différences très importantes entre les trois substrats ; mais pas entre souches sauvage et mutantes. Je vais maintenant mesurer systématiquement les variations des vitesses de respiration en fonction de la concentration en substrat. Il sera possible ainsi de déterminer la concentration saturante pour chacun des trois substrats. Je pourrai également mesurer l'affinité du système respiratoire *in vivo* pour les acides lactiques et pyruvique, les propriétés du système respiratoire *in vivo* pourront être comparées à celles des enzymes impliquées dans la respiration de ces substrats lorsqu'elles sont étudiées *in vitro*. Les comportements des souches sauvages et des souches mutantes seront mis en parallèle.

Quelques remarques s'imposent sur la conduite expérimentale des mesures, leur reproduction graphique ou numérique, sur l'analyse statistique des résultats et leur interprétation à la fois biochimique et génétique. Chaque enzyme est caractérisée par deux paramètres intrinsèques qui peuvent être déterminés à partir de la loi de Victor Henri-Michaelis. Ces deux paramètres sont la vitesse maximum Vm et la constante

de Michaelis Km. La loi de Victor Henri-Michaelis étudie la variation de la vitesse V en fonction de la concentration S et peut s'écrire dans sa forme la plus simple :

$$V = Vm \frac{S}{S + Km}$$

On sait également que dans certains cas limites la constante de Michaelis est égale à la constante de dissociation enzyme-substrat, c'est-à-dire à l'inverse de la constante d'affinité. Lorsqu'on étudie une réaction enzymatique isolée, il est suffisant, pour déterminer les deux paramètres Vm et Km, de faire varier la concentration en substrat par un facteur de l'ordre de 5 à 10, à condition que cette zone soit dans le voisinage du Km. Dans ce qui va suivre, je n'ai pas étudié un système enzymatique isolé mais une cellule entière.

Cette technique est inhabituelle en physiologie cellulaire ; à ma connaissance, un travail de ce genre n'a jamais été entrepris d'une manière systématique :

a) Je vais étudier la variation de la vitesse de respiration par une cellule intacte en fonction de la concentration initiale en substrat sur une zone de concentration beaucoup plus grande que celle explorée habituellement. Les concentrations varieront par un facteur 500.

b) Je comparerai les variations de la vitesse sur trois substrats différents : acide pyruvique, acide L-lactique et acide D-lactique. J'utiliserai des souches de génotype sauvage (PL/PL) et de génotype mutant colonie lisse (pl_1pl_1 ou pl_5pl_5) ; ces souches diffèrent par le métabolisme de l'un au moins des trois substrats étudiés.

c) Toutes ces comparaisons seront effectuées soit avec des populations cellulaires préalablement induites par culture sur acide D,L-lactique, soit avec des populations non induites cultivées sur glucose.

J'ai utilisé des souches diploïdes (cf. chapitre IV § I) ce qui permet d'éviter l'apparition de colonies lisses au cours de la culture sur acide lactique des souches plissées homozygotes pour tous les gènes PL.

L'apparition de colonies lisses est possible en principe dans les souches hétérozygotes PL/*pl* cultivées sur acide lactique ; le taux de sélection en faveur des mutants colonies lisses est suffisamment faible pour que la population ne soit pas envahie par les colonies lisses après un petit nombre de générations cellulaires effectuées sur acide lactique. De nombreux contrôles faits au cours de ces expériences donnent toujours chez les souches sauvages 100 p. 100 de colonies plissées : ce chiffre est établi par l'étalement de plus de 5 000 colonies.

d) Le dispositif expérimental est assez complexe puisque j'étudie 3 souches, 3 substrats et 2 milieux de culture. Toutes les combinaisons possibles de ces facteurs seront analysées statistiquement et comparées deux à deux .Afin de rendre cette analyse statistique plus aisée, j'ai dû normaliser la présentation des résultats. Les moyens techniques dont je disposais ne me permettaient pas de faire simultanément, sur la même culture, toutes les déterminations nécessaires à la réalisation d'une expérience du type suivant : mesure des vitesses de respiration d'une souche cultivée sur glucose pour les trois substrats, chacun d'eux étant étudié avec 12 concentrations différentes. La vitesse de la respiration variant beaucoup en fonction du stade de la culture, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans deux expériences différentes. Étant donné que ce qui nous intéresse est la variation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat et non sa valeur absolue, j'ai normalisé tous les résultats en expri-

mant dans chaque expérience effectuée avec une culture déterminée, les vitesses de respiration en pourcentage de la vitesse de respiration à la concentration 38 mM. Cette manière de procéder élimine les erreurs dues à la détermination de la matière sèche ou aux variations de la capacité respiratoire globale en fonction du stade de la croissance de chaque culture. La concentration prise comme étalon de la standardisation, 38 mM, a été choisie parce qu'elle se trouve environ au milieu de la zone de concentration étudiée. J'ai d'autre part un nombre de données important sur le comportement de la levure en présence de cette concentration en substrat (cf. chapitre IV, § II). Les vitesses de respiration ont été mesurées entre 0 et 15 mn ; j'ai vérifié chaque fois que la quantité de substrat consommée par la levure au cours de la mesure n'était pas suffisante pour épuiser le substrat ou pour modifier considérablement sa concentration (cf. chapitre IV, § IIB). La vitesse de la respiration a été calculée en corrigeant pour les activités endogènes ; en effet l'addition des trois substrats utilisés ne modifie pas la respiration endogène (cf. chapitre IV, § IIA). Il est donc indispensable de soustraire l'activité endogène de la vitesse de respiration obtenue dans chaque mesure pour déterminer la vitesse de respiration du substrat étudié.

e) Je vais essayer de dégager de cette étude des paramètres qui, au point de vue formel, correspondent aux paramètres Vm et Km des réactions enzymatiques. Dans un cas particulier, je vais trouver également un paramètre qui correspond à une constante d'inhibition Ki. Du fait que je mesure la vitesse d'un phénomène contrôlé par la cellule entière, il est évident qu'on ne peut pas assimiler les paramètres trouvés à une constante de Michaelis de réaction enzymatique ; la chaîne respiratoire responsable de l'oxydation de ces substrats par la levure est constituée par une dizaine de réactions enzymatiques et se trouve précédée par tous les phénomènes d'entrée ou éventuellement de concentration des molécules dans la cellule. Les paramètres seront cependant très utiles pour comparer les différentes souches et les différentes conditions de cultures. Dans la discussion, je comparerai ces résultats aux constantes des enzymes intervenant dans les réactions. Au cours de l'exposé j'ai utilisé le terme « affinité » bien qu'il ne s'agisse pas d'une mesure de l'affinité enzyme-substrat mais simplement d'une étude des variations de la vitesse V de la respiration en fonction de la concentration s en substrat.

B — Étude de l'« affinité » pour l'acide D-lactique

a) « *Affinité* » *pour l'acide D-lactique de la levure cultivée sur glucose*

J'ai mesuré les vitesses V de respiration de la levure pour des concentrations en acide D-lactique comprises entre 0,38 mM et 190 mM.

La figure 14 représente en coordonnées semi-logarithmiques l'évolution de la vitesse de respiration de l'acide D-lactique en fonction de la concentration molaire en substrat.

Je donne les résultats obtenus pour la souche sauvage 4 et pour les souches mutantes 183 (pl_1/pl_1) et 32 (pl_5/pl_5). Chaque point figurant sur le graphique représente la moyenne de plusieurs déterminations obtenues dans des expériences différentes. Notons d'abord que les courbes obtenues pour les souches mutantes et pour la souche

sauvage sont comparables ; je n'ai tracé sur le graphique qu'une seule courbe. Nous voyons également que l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration suit une loi complexe ; nous pouvons distinguer trois zones :

1°) pour les concentrations comprises entre 0,38 mM et 3,8 mM, nous obtenons la deuxième partie d'une courbe michaélienne ;

2°) la zone comprise entre 3,8 mM et 76 mM donne également une courbe michaélienne ; cette courbe n'est pas complète et est tronquée à partir d'une concentration 76 mM ;

3°) au-delà d'une concentration 76 mM, la vitesse diminue avec la concentration. Le substrat inhibe la réaction.

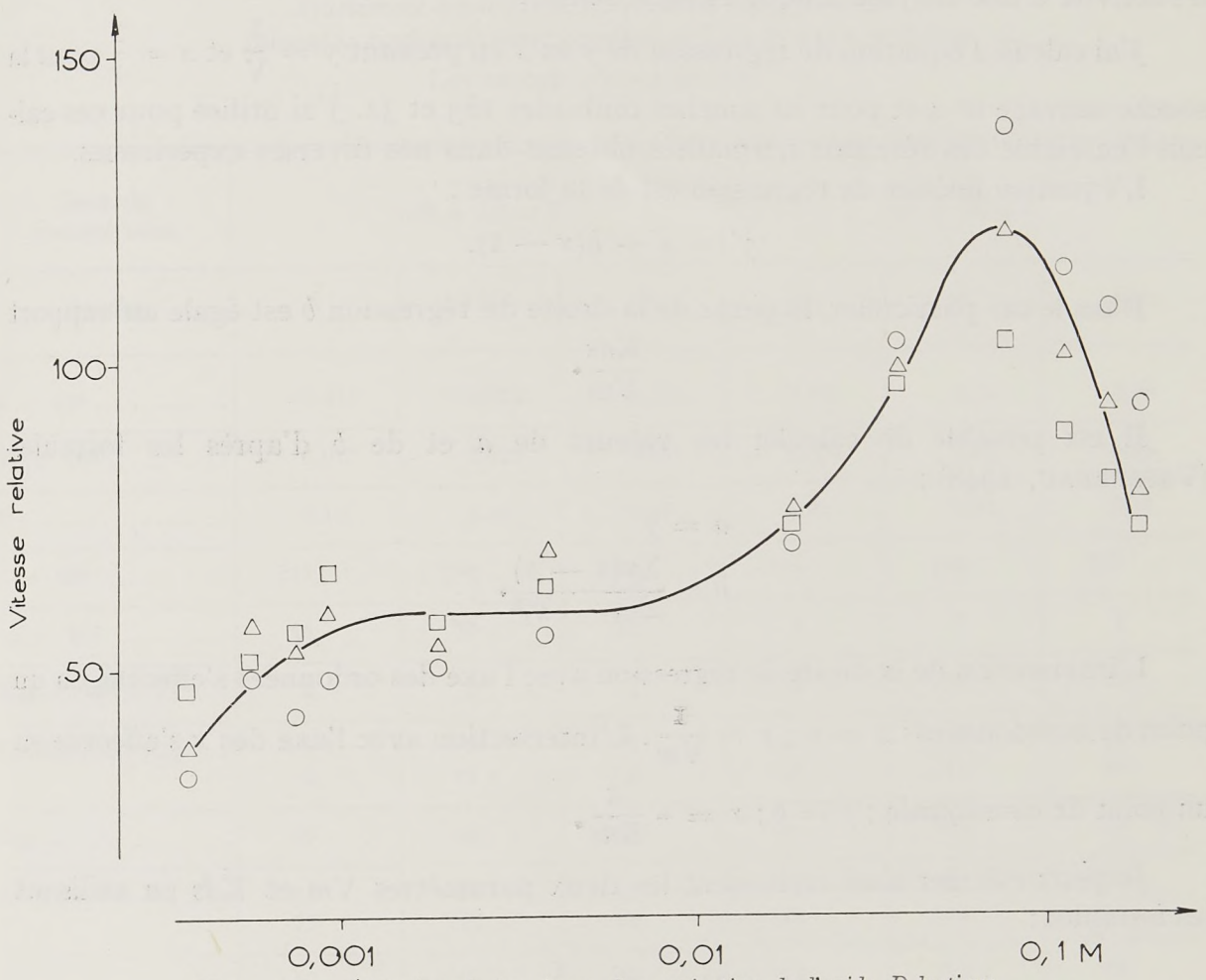


FIG. 14. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide D-lactique en fonction de la concentration en substrat*

Levure cultivée sur glucose

En abscisse : concentration molaire, représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration, exprimée en pourcentage de la vitesse de respiration à la concentration de 38 mM.

Cercles : souche 4
Triangles : souche 183
Carrés : souche 32

L'examen du graphique 14 semble indiquer nettement la présence de deux zones successives où la relation vitesse/concentration suit la loi de Victor Henri-Michaelis. Ces courbes sont des ajustements à vue. Afin de vérifier si nous avons bien deux courbes du type Victor Henri-Michaelis, j'ai traité les résultats expérimentaux en effectuant un ajustement selon LINEWEAVER et BURK. On sait que la loi d'Henri-

Michaelis peut être transformée par l'ajustement de LINEWEAVER et BURK. Cette transformation donne en coordonnées linéaires une droite d'équation :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vm} + \frac{Kds}{Vm} \cdot \frac{1}{s}$$

où V est la vitesse de la réaction ; s est la concentration molaire ; Vm est la vitesse maximum de la réaction ; Kds est la constante de demi-saturation.

La constante de demi-saturation Kds représente l'équivalent de la constante de Michaelis Km dans les réactions enzymatiques ; j'ai préféré utiliser ce symbole pour bien marquer que la réaction est étudiée *in vivo* et ne correspond pas nécessairement à l'activité d'une enzyme unique et bien définie.

J'ai calculé l'équation de régression de y en x en prenant $y = \frac{1}{V}$ et $x = \frac{1}{s}$ pour la souche sauvage n° 4 et pour les souches mutantes 183 et 32. J'ai utilisé pour ces calculs l'ensemble des résultats normalisés obtenus dans nos diverses expériences.

L'équation linéaire de régression est de la forme :

$$y' = a + b(x - \bar{x}).$$

Dans le cas particulier, la pente de la droite de régression b est égale au rapport

$$\frac{Kds}{Vm}.$$

Il est possible de calculer les valeurs de a et de b d'après les formules (VESSEREAU, 1948) :

$$a = \bar{y}$$

$$b = \frac{\Sigma y(x - \bar{x})}{\Sigma(x - \bar{x})^2}.$$

L'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées s'effectue en un point de coordonnées : $x = 0$; $y = \frac{1}{Vm}$. L'intersection avec l'axe des x s'effectue en un point de coordonnée : $y = 0$; $x = -\frac{1}{Kds}$.

Je peux calculer ainsi facilement les deux paramètres Vm et Kds en utilisant les formules :

$$Vm = \frac{1}{a - b\bar{x}}.$$

$$Kds = \frac{b}{a - b\bar{x}}$$

Rappelons que l'estimation de la variance σ^2 liée à x de la variable dépendante est :

$$S^2 = \frac{\Sigma(y - y')^2}{N - 2}.$$

Le calcul de $\Sigma\,(y - y')^2$ peut s'effectuer grâce à la relation :

$$\Sigma(y - y')^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} - b^2\left(\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}\right).$$

Les variances de a et de b sont, en fonction de σ^2 :

$$\sigma_a^2 = \frac{\sigma^2}{N}; \qquad \sigma_b^2 = \frac{\sigma^2}{\Sigma(x - \bar{x})^2}.$$

Le tableau 37 donne les valeurs obtenues pour la pente b de la droite de régression et son écart type, la probabilité P pour que b ne soit pas différent de zéro, les valeurs de a et de son écart type. Il donne également les valeurs de Kds et Vm calculées d'après l'équation de la droite de régression et les valeurs extrêmes que ces paramètres peuvent prendre en fonction de l'erreur (double de l'écart type) effectuée sur la détermination de a et de b. Il indique enfin le nombre N de déterminations utilisées dans le calcul.

TABLEAU 37

Affinité du système respiratoire pour l'acide D-lactique.
Ajustement à une droite des résultats expérimentaux
suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK
Levure cultivée sur glucose

Zone de concentration	0,38 à 3,8 mM			3,8 à 76 mM		
Souche	4	183	32	4	183	32
$b \times 10^4$	0,031	0,046	0,013	0,35	0,23	0,30
$S_b \times 10^4$	0,017	0,026	0,014	0,08	0,07	0,04
P	0,10	0,10	0.40	0,01	0,01	0,01
$a \times 10^4$	217	196	199	126	120	127
$S_a \times 10^4$	14	20	11	8	7	4
K$ds \times 10^4$.....	2	3	1	36	23	29
Limites pour Kds ...	— 0,1 5	— 3 11	— 1 3	16 62	8 42	19 46
Vm	55	68	55	103	100	99
Limites pour Vm	44 75	46 127	45 70	84 132	85 122	90 114
N	17	16	20	18	18	18

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression b et son écart-type Sb ; la probabilité P pour b de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre a et son écart-type Sa ; la constante de demi-saturation Kds et la vitesse maximum Vm ; les valeurs limites de ces deux paramètres Kds et Vm. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

Dans la zone de concentration comprise entre 0,38 mM et 3.8 mM, la pente *b* de la droite de régression n'est pas significativement différente de zéro. Ce résultat traduit le fait qu'une fraction importante des points expérimentaux se trouve située dans le palier visible sur le graphique entre 0,94 mM et 3,8 mM. Il apparaît nettement sur la figure n° 14 que je ne possède que la deuxième moitié de la courbe d'apparence michaélienne étudiée.

Dans ces conditions, les droites de régression calculées ne donnent pas d'indications précises sur la cinétique de la réaction étudiée ; en particulier, les constantes de demi-saturation ne correspondent pas aux valeurs réelles. Je ne donne les équations de ces droites de régression qu'à titre indicatif ; elles constituent un bon moyen de comparer les souches sauvages et les souches mutantes. Les valeurs de *b* observées pour 4, 183 et 32 ne sont pas significativement différentes entre elles. Les valeurs trouvées pour la constante de demi-saturation sont comparables pour les trois souches. Les vitesses maxima *Vm* sont nettement inférieures à la vitesse de respiration pour une concentration de 38 mM.

Dans la deuxième zone de concentration comprise entre 3,8 et 76 mM, la pente *b* de la droite de régression est par contre significativement différente de zéro ; les différences observées entre les trois souches pour la valeur de *b* ne sont pas significatives. Les constantes de demi-saturation sont beaucoup plus élevées que dans la première zone de concentration :

36.10^{-4} pour la souche 4
23.10^{-4} pour la souche 183
29.10^{-4} pour la souche 32.

Les vitesses maxima sont très voisines de la vitesse de respiration à la concentration de 38 mM. Nous n'observons pas de différences significatives entre souches sauvage et mutantes pour les paramètres *Vm* et *Kds* (voir tabl. 37).

Nous trouvons dans cette zone de concentration une vitesse maximum anormalement faible puisque nous savons que la saturation du système n'est pas obtenue à 38 mM mais à 76 mM.

De même, la constante de demi-saturation devrait être nettement plus élevée que 36.10^{-4} M. L'ajustement semble meilleur s'il est réalisé en ne prenant que la portion pseudo-linéaire du graphique entre 19 mM et 76 mM. Dans ce cas je trouve des valeurs beaucoup plus élevées pour la constante de demi-saturation :

349.10^{-4} pour la souche 4
232.10^{-4} pour la souche 183
126.10^{-4} pour la souche 32

La vitesse maximum est de 188 pour la souche 4
156 pour la souche 183
125 pour la souche 32.

La comparaison des pentes des droites de régression, des vitesses maxima et des constantes de demi-saturation ne montre pas de différences significatives entre les diverses souches dans cette zone de concentration.

Enfin, dans la troisième zone de concentration comprise entre 76 mM et 190 mM, les pentes *b* des droites de régression sont toutes négatives et significativement différentes de zéro. Il y a, à ces concentrations, une inhibition de la respiration

de l'acide D-lactique par un excès de substrat. Aucune différence significative n'apparaît entre les souches pour les valeurs de b. Les vitesses maxima et les constantes de demi-saturation données par ce calcul n'ont pas de signification ; l'ajustement de LINEWEAVER et BURK (I/V en fonction de I/s) ne convient pas pour l'étude d'un phénomène d'inhibition. J'ai fait pour cette zone un nouvel ajustement à une droite : I/V en fonction de s (fig. 15). Aucune différence n'étant apparue entre souche

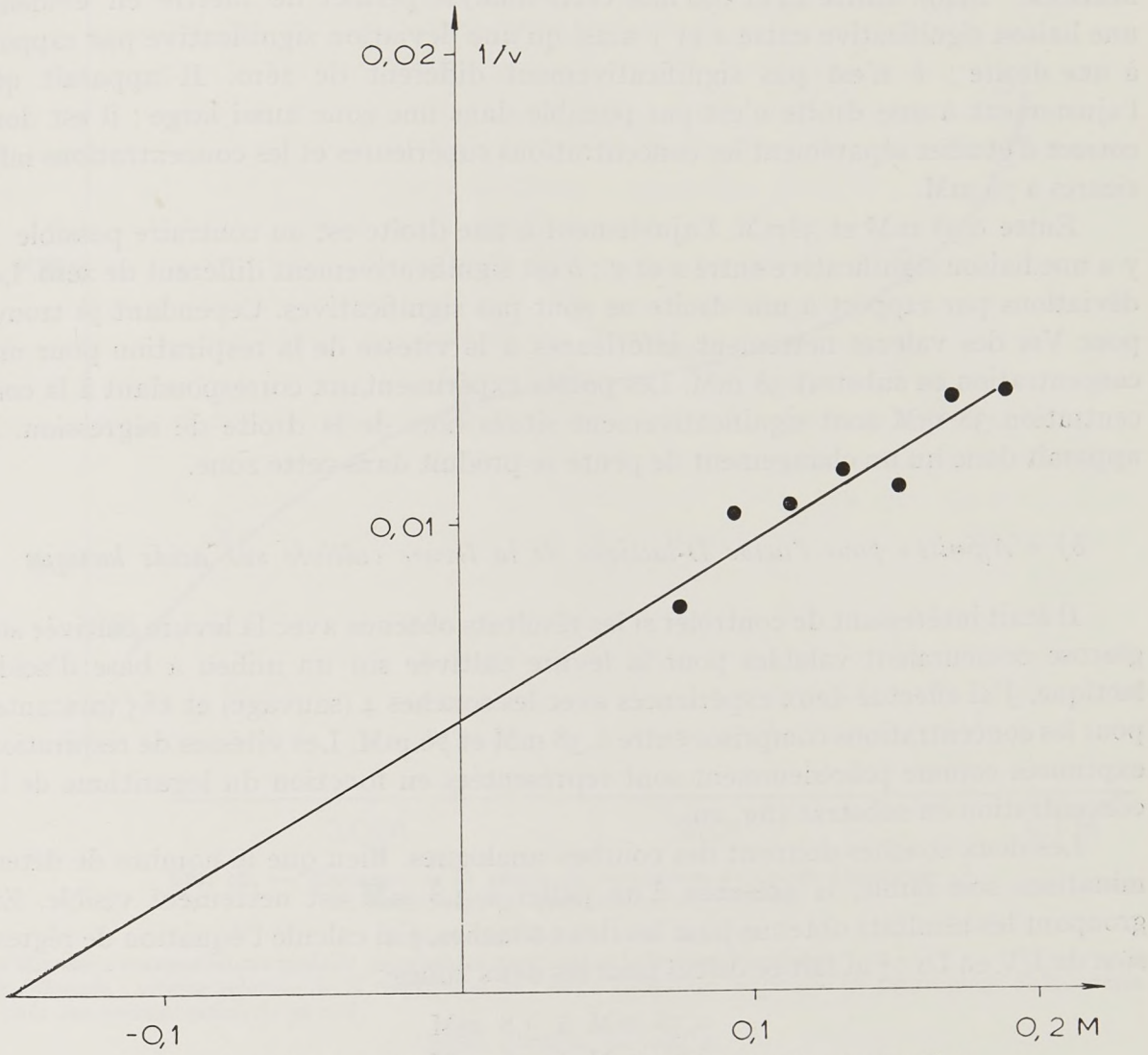


FIG. 15. — *Étude de l'inhibition de l'acide D-lactique par les concentrations en substrat supérieures à 76 mM*
Levure cultivée sur glucose
En abscisse : concentrations molaires en substrat
En ordonnée : inverse de la vitesse
Les résultats obtenus sur les souches 4, 32 et 183 ont été groupés

sauvage et mutants pour la respiration de l'acide D-lactique, j'ai rassemblé pour ce calcul l'ensemble des résultats obtenus pour toutes les souches isogéniques ne différant que par les gènes pl_1PL_1 ou pl_5PL_5 J'ai ainsi groupé les expériences réalisées avec les souches 4, 183, 32. L'équation de la droite de régression a été calculée. J'ai trouvé :

$$a = 106.10^{-4} \qquad Sa = 3.10^{-4}$$
$$b = 0{,}04 \qquad Sb = 0{,}007$$
$$N = 29$$

La constante de demi-inhibition Kd_i est égale à : 0,15 M. La probabilité pour b de ne pas être différent de zéro est de : 0,01. Il y a bien une inhibition de la respiration de l'acide D-lactique pour les concentrations supérieures à 76 mM.

J'ai voulu vérifier que le choix des 3 zones de concentration était vraiment correct. J'ai procédé à l'ajustement de LINEWEAVER et BURK pour des zones plus vastes en effectuant l'analyse de la variance pour les trois souches (VESSEREAU, 1948; MATHER, 1949). Entre 19 et 190 mM cette analyse permet de mettre en évidence une liaison significative entre x et y ainsi qu'une déviation significative par rapport à une droite ; b n'est pas significativement différent de zéro. Il apparaît que l'ajustement à une droite n'est pas possible dans une zone aussi large ; il est donc correct d'étudier séparément les concentrations supérieures et les concentrations inférieures à 76 mM.

Entre 0,38 mM et 38mM, l'ajustement à une droite est au contraire possible. Il y a une liaison significative entre x et y ; b est significativement différent de zéro. Les déviations par rapport à une droite ne sont pas significatives. Cependant je trouve pour Vm des valeurs nettement inférieures à la vitesse de la respiration pour une concentration en substrat 38 mM. Les points expérimentaux correspondant à la concentration 38 mM sont significativement situés hors de la droite de régression. Il apparaît donc qu'un changement de pente se produit dans cette zone.

b) « Affinité » pour l'acide D-lactique de la levure cultivée sur acide lactique

Il était intéressant de contrôler si les résultats obtenus avec la levure cultivée sur glucose demeuraient valables pour la levure cultivée sur un milieu à base d'acide lactique. J'ai effectué deux expériences avec les souches 4 (sauvage) et 183 (mutante) pour les concentrations comprises entre 0,38 mM et 76 mM. Les vitesses de respiration exprimées comme précédemment sont représentées en fonction du logarithme de la concentration en substrat (fig. 16).

Les deux souches donnent des courbes analogues. Bien que le nombre de déterminations soit faible, la présence d'un palier à 3,8 mM est nettement visible. En groupant les résultats obtenus pour les deux souches, j'ai calculé l'équation de régression de I/V en I/s ; j'ai fait ce calcul pour les deux zones :

0,38 mM à 3,8 mM
3,8 mM à 76 mM.

Entre 0,38 mM et 3,8 mM, la droite de régression a une pente significativement différente de zéro. J'ai obtenu dans cette zone :

Vm = 92 ; valeurs limites : 79 et 111.
Kds = 3.10^{-4} ; valeurs limites : 2.10^{-4} et 6.10^{-4}.
N = 8.

Dans la zone de concentration comprise entre 3,8 mM et 76 mM, la pente de la droite de régression est significativement différente de zéro. J'ai trouvé dans cette zone :

Vm = 114 ; valeurs limites : 105 et 124.
Kds = 15.10^{-4} ; valeurs limites : 9.10^{-4} et 22.10^{-4}.
N = 6.

La comparaison de ces valeurs avec les résultats du tableau 37 montre que les constantes de demi-saturation obtenues avec les levures cultivées sur acide lactique et avec les levures cultivées sur glucose, ne sont pas significativement différentes. Les

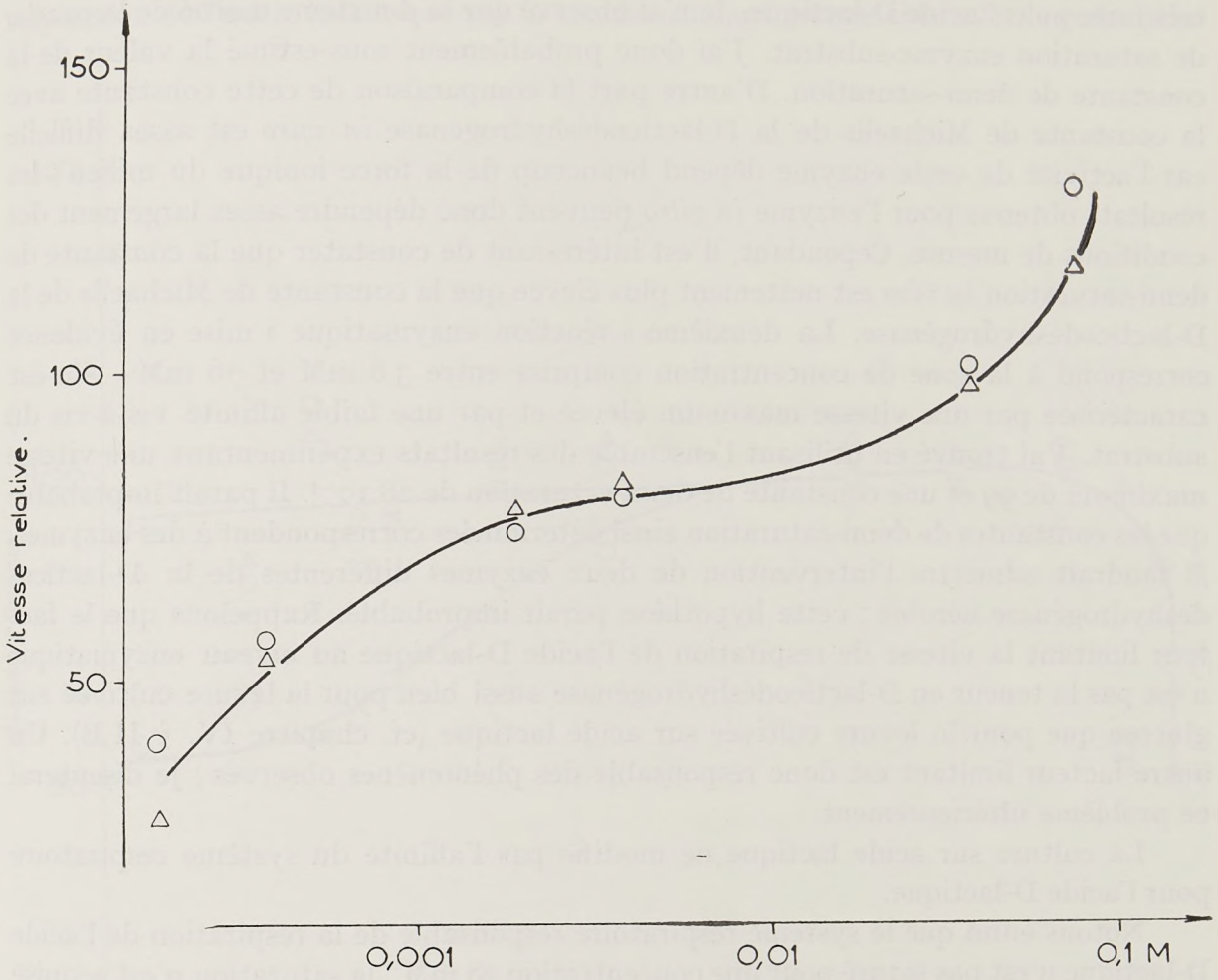


FIG. 16. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide D-lactique en fonction de la concentration en substrat*

Levure cultivée sur acide lactique
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide D-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse pour une concentration de 38 mM.

Cercles : souche sauvage 4.
Triangles : résultats groupés des souches mutantes 32 et 183.

vitesses maxima semblent légèrement plus élevées pour la première zone chez la levure cultivée sur acide lactique. En définitive, la culture sur acide lactique n'a pas modifié notablement l'« affinité » du système respiratoire de la levure pour l'acide D-lactique.

c) Discussion du paragraphe III — B

Ces observations permettent quelques remarques intéressantes. Tout d'abord, la mutation colonie lisse ne modifie pas l'affinité du systéme respiratoire pour l'acide D-lactique.

L'évolution de la vitesse de respiration de l'acide D-lactique en fonction de

sa concentration suit une loi assez compliquée. Tout se passe comme si nous nous trouvions en présence de deux réactions enzymatiques successives. La première correspond à des concentrations en acide D-lactique inférieures à 3,8 mM ; elle est caractérisée par une vitesse maximum très faible et par une affinité très forte pour l'acide D-lactique. Je n'ai observé que la deuxième moitié de la courbe de saturation enzyme-substrat. J'ai donc probablement sous-estimé la valeur de la constante de demi-saturation. D'autre part la comparaison de cette constante avec la constante de Michaelis de la D-lacticodéshydrogénase *in vitro* est assez difficile car l'activité de cette enzyme dépend beaucoup de la force ionique du milieu ; les résultats obtenus pour l'enzyme *in vitro* peuvent donc dépendre assez largement des conditions de mesure. Cependant, il est intéressant de constater que la constante de demi-saturation *in vivo* est nettement plus élevée que la constante de Michaelis de la D-lacticodéshydrogénase. La deuxième « réaction enzymatique » mise en évidence correspond à la zone de concentration comprise entre 3,8 mM et 76 mM ; elle est caractérisée par une vitesse maximum élevée et par une faible affinité vis-à-vis du substrat. J'ai trouvé en utilisant l'ensemble des résultats expérimentaux une vitesse maximum de 99 et une constante de demi-saturation de 28.10^{-4}. Il paraît improbable que les constantes de demi-saturation ainsi déterminées correspondent à des enzymes. Il faudrait admettre l'intervention de deux enzymes différentes de la D-lacticodéshydrogénase aérobie ; cette hypothèse paraît improbable. Rappelons que le facteur limitant la vitesse de respiration de l'acide D-lactique au niveau enzymatique n'est pas la teneur en D-lacticodéshydrogénase aussi bien pour la levure cultivée sur glucose que pour la levure cultivée sur acide lactique (cf. chapitre IV, § II B). Un autre facteur limitant est donc responsable des phénomènes observés ; je discuterai ce problème ultérieurement.

La culture sur acide lactique ne modifie pas l'affinité du système respiratoire pour l'acide D-lactique.

Notons enfin que le système respiratoire responsable de la respiration de l'acide D-lactique n'est pas saturé pour une concentration 38 mM ; la saturation n'est acquise que pour 76 mM.

A cette dernière concentration la vitesse de respiration est en moyenne de 20 p. 100 supérieure à celle observée pour 38 mM. Cette remarque ne peut modifier les conclusions du paragraphe précédent où sont comparées les vitesses de respiration du glucose et de l'acide D-lactique à la concentration 38 mM. La respiration du glucose est plus rapide que celle de l'acide D-lactique pour la concentration saturante 76 mM chez la levure cultivée sur glucose.

C. — Étude de l'« affinité » pour l'acide L-lactique

a) « *Affinité* » *pour l'acide L-lactique de la levure cultivée sur glucose*

L'« affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique a été mesurée dans les mêmes conditions que pour l'acide D-lactique.

La figure n° 17 représente en coordonnées semi-logarithmiques l'évolution de la vitesse V de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration molaire en substrat.

Chaque point du graphique représente la moyenne de plusieurs déterminations obtenues dans des expériences différentes. Un simple examen du graphique montre que la courbe expérimentale obtenue pour la souche sauvage n° 4 est différente de celle obtenue pour les souches mutantes 183 (pl_1/pl_1) et 32 (pl_5/pl_5). La vitesse de la respiration de l'acide L-lactique par la souche sauvage 4 augmente avec la concentra-

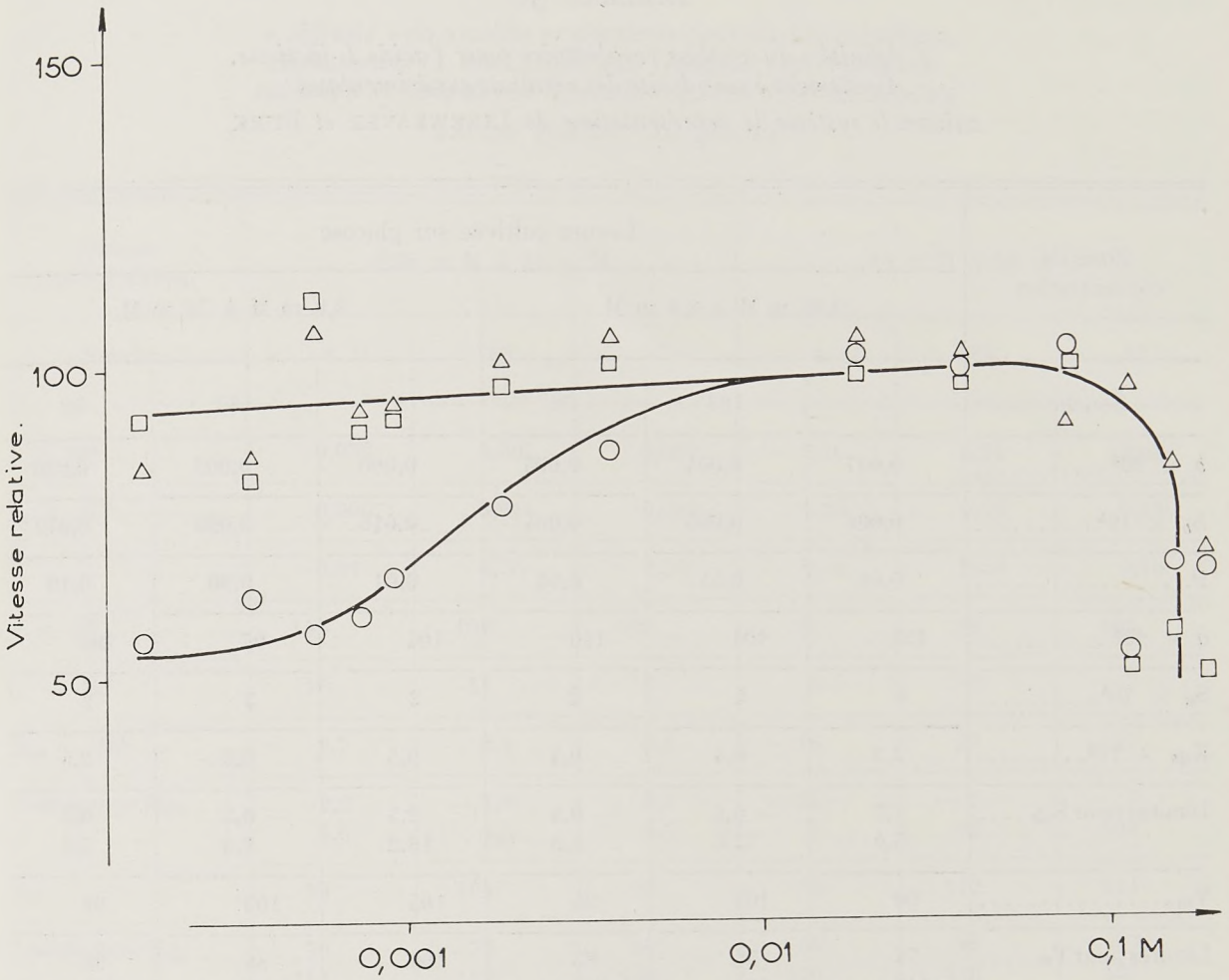


FIG. 17. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration en substrat*

Levure cultivée sur glucose

En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide L-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse pour une concentration de 38 mM.

Cercles : souche sauvage 4
Triangles : souche mutante 183.
Carrés : souche mutante 32.

tion en substrat entre 0,38 mM et 19 mM ; cette vitesse est relativement constante entre 19 mM et 76 mM. Enfin, pour les concentrations supérieures à 76 mM une inhibition de la respiration par le substrat apparaît nettement. Les souches mutantes 183 et 32 se comportent très différemment de la souche sauvage : la vitesse de la respiration est pratiquement constante pour des concentrations en substrat comprises entre 0,38 mM et 76 mM ; au-delà de 76 mM la respiration est inhibée par le substrat comme pour la souche sauvage.

L'ajustement à une droite des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK a été effectué. Le choix des zones de concentration où le calcul est appliqué est délicat et demeure, en partie, arbitraire. J'ai étudié deux zones entre 0,38 et 76 mM ; mais j'ai effectué les ajustements en réalisant deux subdivisions différentes dans cet intervalle de concentrations.

TABLEAU 38

« Affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique. Ajustement à une droite des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK

Zone de concentration	Levure cultivée sur glucose					
	0,38 m M à 3,8 m M			3,8 m M à 76 m M		
Souche	4	183	32	4	183	32
$b \times 10^4$	0,037	0,004	0,004	0,090	0,005	0,036
$S_b \times 10^4$.....	0,008	0,005	0,004	0,016	0,026	0,019
P.....	0,01	0,55	0,40	0,01	0,90	0,10
$a \times 10^4$	153	101	110	104	97	105
$S_a \times 10^4$.....	6	4	3	2	3	2
$K_{ds} \times 10^4$.....	3,3	0,4	0,4	9,5	0,5	3,5
Limites pour K_{ds}	1,7 5,0	— 0,6 1,6	— 0,4 1,3	2,5 13,2	— 0,3 1,3	— 0,3 7,6
V_m.....	90	103	95	105	103	98
Limites pour V_m	76 111	56 641	85 108	100 111	88 125	93 104
N	34	38	29	25	28	22

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression *b* et son écart type S*b* ; la probabilité P pour *b* de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre *a* et son écart-type S*a* ; la constante de demi-saturation K*ds* la vitesse maximum V*m* ; les valeurs limites de ces deux paramètres K*ds* et V*m*. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

J'ai pris d'abord les zones de concentrations choisies précédemment pour l'étude de l'acide D-lactique (tabl. 38). J'ai pensé qu'il serait ainsi plus aisé de comparer les résultats obtenus sur les deux stéréoisomères. Mais il apparaît nettement sur les graphiques (fig. 14 et 17) que les courbes obtenues pour les acides D et L-lactiques sont différentes. Il m'a paru souhaitable d'effectuer aussi des ajustements choisis en fonction des résultats du seul acide L-lactique (fig. 17) : j'ai donc étudié les deux zones 0,38 mM à 19 mM et 19 mM à 76 mM (tabl. 39).

Je vais étudier d'abord les résultats groupés dans le tableau 38. Entre 0,38 mM et 3,8 mM, la souche 4 présente une pente de la droite de régression significativement différente de zéro. La vitesse maximum est légèrement inférieure à la vitesse de respiration pour une concentration 38 mM.

TABLEAU 39

« Affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique. Ajustement à une droite des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK

Levure cultivée sur glucose

Zone de concentration	0,38 m M à 19 m M			19 m M à 76 m M		
Souche	4	183	32	4	183	32
$b \times 10^4$	0,039	0,004	0,006	— 0,16	0,24	0,43
$S_b \times 10^4$.....	0,006	0,014	0,004	0,23	0,22	0,18
P.....	0,01	0,76	0,20	0,60	0,40	0,10
$a \times 10^4$	145	100	108	96	96	104
$S_a \times 10^4$.....	16	11	1	3	3	3
$K_{ds} \times 10^4$.....	3,7	0,4	0,6	— 16	27	47
Limites pour K_{ds} ...	2,2 5,6	— 1,9 4,5	— 0,3 1,6	— 54 3	— 2 92	7 101
V_m.....	93	104	98	99	112	111
Limites pour V_m.....	70 141	77 162	90 108	68 179	96 136	97 131
N.....	38	43	35	10	10	8

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression b et son écart-type S_b ; la probabilité P pour b de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre a et son écart-type S_a ; la constante de demi-saturation K_{ds} et la vitesse V_m, les valeurs limites de ces deux paramètres K_{ds} et V_m. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

La constante de demi-saturation ($3{,}3.10^{-4}$) est très voisine de la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase. Dans cette même zone, les pentes des droites de régression obtenues pour 32 et 183 ne sont pas significativement différentes de zéro. Les constantes de demi-saturation calculées dans ces conditions n'ont pas de signification ; les estimations qui en ont été faites sont environ 10 fois plus faibles que la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase. Les vitesses maxima obtenues pour les trois souches 4, 183 et 32 ne sont pas en définitive signi-

ficativement différentes de la vitesse de respiration pour la concentration de référence 38 mM. Nous observons par contre que la pente de la droite de régression et la constante de demi-saturation de la souche n° 4 sont significativement différentes de celles des souches n° 183 et 32.

J'ai comparé ces résultats à ceux obtenus pour l'acide D-lactique dans la même zone de concentration en groupant les données relatives aux trois souches 4, 183 et 32 (tabl. 42).

Il apparaît tout d'abord que les vitesses maxima des trois souches sont voisines de la vitesse pour la concentration de référence 38 mM pour l'acide L-lactique et nettement moins élevées pour l'acide D-lactique. Cela traduit le fait que les systèmes respiratoires des 3 souches sont saturés par l'acide L-lactique pour des concentrations inférieures à 38 mM alors qu'il n'en est pas ainsi pour l'acide D-lactique. La pente de la droite de régression et la constante de demi-saturation ont par contre des valeurs très voisines dans cette zone dans le cas de l'acide D-lactique et des trois souches d'une part et dans le cas de l'acide L-lactique et de la souche 4 d'autre part.

Entre 3,8 mM et 76 mM, la souche 4 présente à nouveau une pente significativement différente de zéro pour la droite de régression ; les droites de régression des souches 183 et 32 ont au contraire des pentes très faibles et non significativement différentes de zéro.

Les vitesses maxima sont encore voisines de la vitesse de respiration pour la concentration de référence 38 mM aussi bien pour la souche sauvage n° 4 que pour les deux souches mutantes n° 183 et 32. La souche 4 présente pour la pente de la droite de régression et pour la constante de demi-saturation des différences significatives avec la souche 183 mais pas avec la souche 32. Les résultats dans cette zone sont faussés par le fait que la vitesse ne varie pas entre 19 et 76 mM. La comparaison des résultats obtenus avec l'acide L-lactique et avec l'acide D-lactique montre que les pentes des droites de régression et les constantes de demi-saturation sont significativement différentes. Dans cette zone de concentration la vitesse de respiration de l'acide D-lactique varie très vite avec la concentration alors que la vitesse de respiration de l'acide L-lactique est pratiquement constante.

L'étude des données groupées dans le tableau 39 est plus intéressante. Il apparaît que le système respiratoire est saturé par l'acide L-lactique dès 19 mM ; pour toutes les souches, la droite de régression calculée entre 19 mM et 76 mM présente en effet une pente non significativement différente de zéro. Dans la zone de concentration comprise entre 0,38 mM et 19 mM, la droite de régression est sensiblement identique à celle qui avait été obtenue entre 0,38 et 3,8 mM. Pour les deux souches mutantes, ces droites de régression sont horizontales et la saturation du système respiratoire est obtenue pour des concentrations inférieures ou au plus égales à 0,38 mM. Pour la souche 4, j'ai obtenu au contraire une pente significativement différente de zéro. La vitesse maximum Vm est sensiblement égale aux vitesses de respiration pour des concentrations de 19 mM et 38 mM. La constante de demi-saturation du système est très voisine de la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase.

Dans la dernière zone de concentration comprise entre 76 mM et 190 mM, les droites de régression ont des pentes négatives. Bien que ces pentes ne soient pas significativement différentes de zéro, il est permis de penser qu'une action inhibitrice du substrat sur l'activité du système respiratoire se produit aux fortes concentrations. En groupant les résultats obtenus pour les 3 souches, j'ai étudié l'ajustement

à une droite de l'inverse des vitesses de respiration I/V en fonction de la concentration s (fig. 18). Il m'a paru en effet qu'il était possible de grouper les résultats obtenus pour les souches sauvage et mutantes puisqu'elles ne présentent pas de différence dans cette zone de concentration. J'ai trouvé pour la droite de régression les résultats suivants :

$$b = 0{,}0604 \qquad Sb = 0{,}0250$$
$$a = 131.10^{-4} \qquad Sa = 11.10^{-4}$$
$$N = 29$$

La constante de demi-inhibition K*di* est égale à : 0,08 M.

La probabilité pour b de ne pas être différent de zéro est 0,05. La respiration de l'acide L-lactique est donc inhibée pour les concentrations supérieures à 76 mM.

J'ai étudié l'affinité pour l'acide L-lactique du système respiratoire de diverses souches isogéniques des précédentes ; elles étaient hétérozygotes pour le couple de

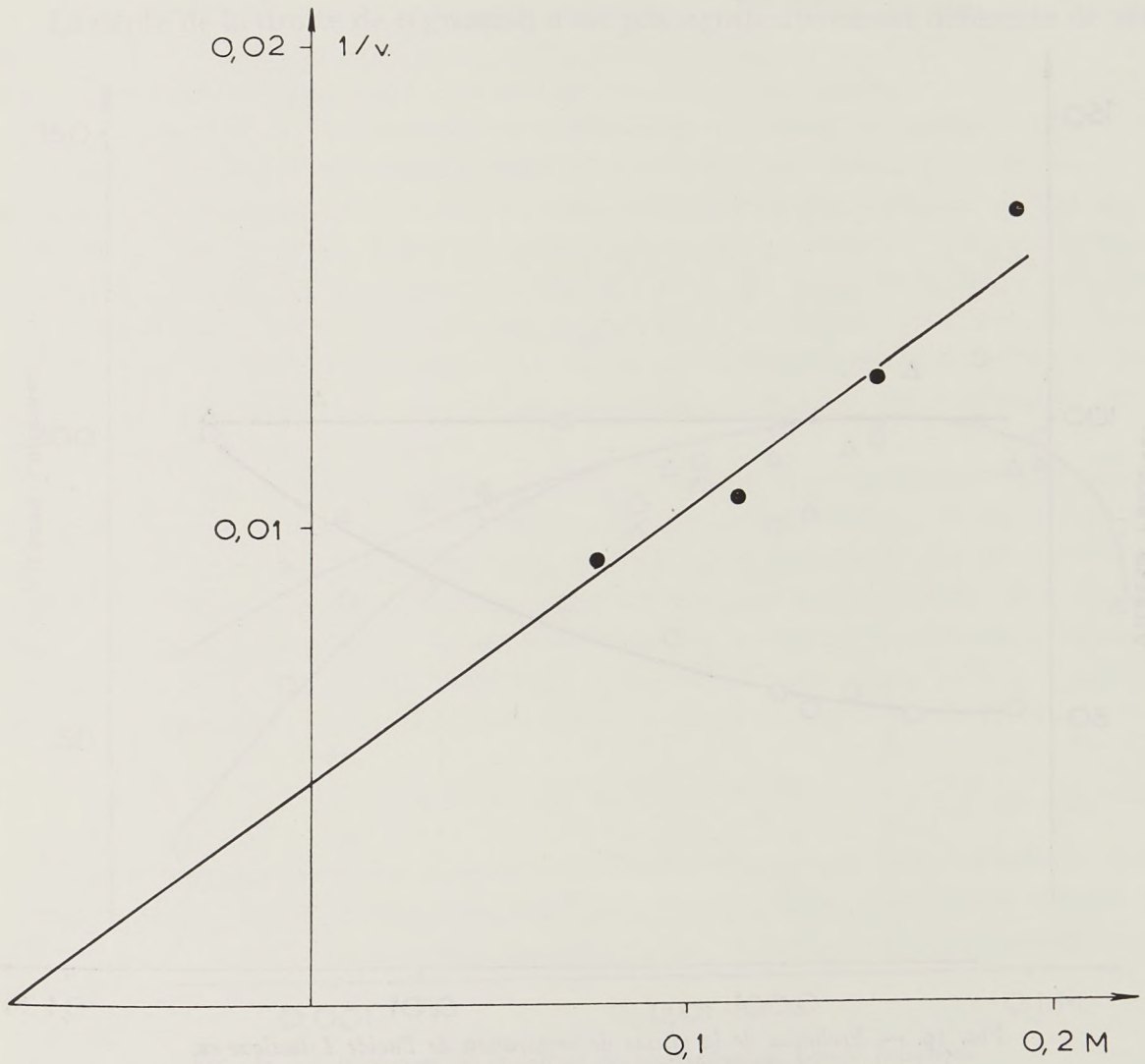


FIG. 18. — *Étude de l'inhibition de la respiration de l'acide L-lactique par des concentrations supérieures à 76 mM*

Levure cultivée sur glucose

En abscisse : concentration molaire en acide L-lactique.
En ordonnée : inverse de la vitesse.

Les résultats obtenus sur les souches 4, 32 et 183 ont été groupés.

gènes PL_1/pl_1 (souche 2), pour le couple PL_5/pl_5 (souche 135), ou pour les deux couples (souche 40). Ces diverses levures ayant donné des résultats extrêmement voisins, je présenterai leurs caractéristiques en les groupant. J'ai étudié également la souche 214, homozygote pour les deux gènes mutés pl_1/pl_1 et pl_5/pl_5. Cette dernière souche n'est pas isogénique des précédentes. La figure 19 présente la variation des valeurs de v en fonction du logarithme de la concentration. Il apparaît que la souche 214 donne des résultats analogues à ceux obtenus pour les souches 32 et 183 alors que les souches hétérozygotes ont un comportement identique à la souche sauvage n° 4. L'ajustement à une droite suivant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK a été effectué pour la zone de concentration comprise entre 0,19 et 19 mM. J'ai trouvé pour les hétérozygotes :

b = 0,014.10^{-4} Sb = 0,006.10^{-4}
Vm = 69 ; limites 50 et 111.
Kds = 1.10^{-4} ; limites 0,2.10^{-4} et 2.10^{-4}
N = 36.

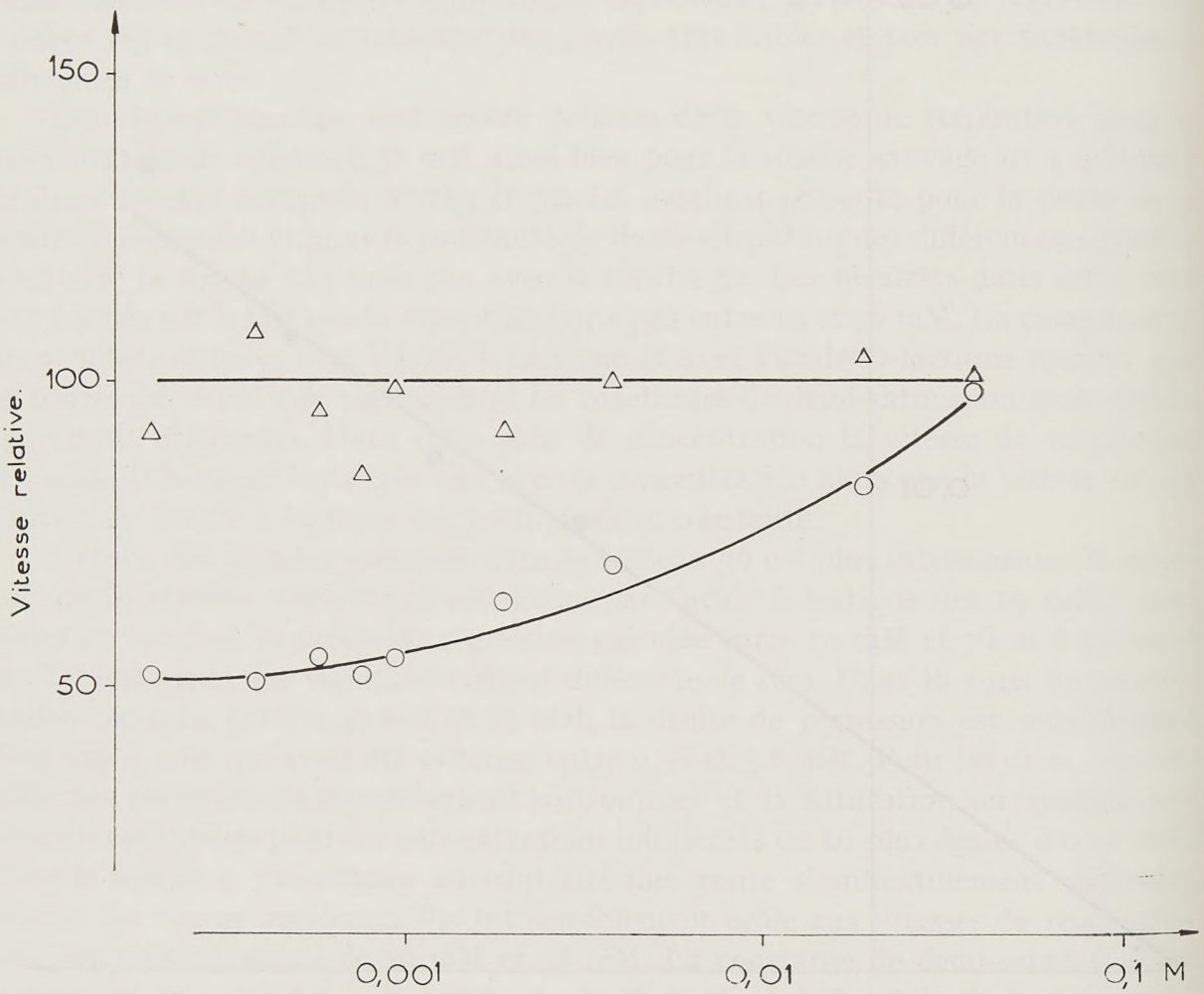


FIG. 19. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration en substrat*

Levure cultivée sur glucose
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide L-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse pour une concentration de 38 mM.
Cercles : souches hétérozygotes.
Triangles : souche 214 (*pl*1/*pl*1 *pl*5/*pl*5).

La pente de la droite de régression est significativement différente de zéro. Cependant, elle est intermédiaire entre les valeurs obtenues pour la souche sauvage homozygote n° 4 et pour les souches mutantes homozygotes n° 183 et 32. Il faut noter également que la constante de demi-saturation (1.10^{-4}) est intermédiaire entre celles obtenues pour la souche sauvage ($3{,}7.10^{-4}$) et pour les souches mutantes ($0{,}5.10^{-4}$). La simple lecture de la figure 19 confirme que les gènes plissés PL sont dominants sur leurs alléles mutés *pl*. Cependant, l'étude statistique des résultats montre que les comportements des souches hétérozygotes et de la souche sauvage ne sont peut-être pas rigoureusement identiques.

La souche 214 portant une double mutation (pl_1/pl_1 ; pl_5/pl_5) a donné :

$b = 0{,}006.10^{-4}$ $\quad Sb = 0{,}008.10^{-4}$
$Vm = 82$; limites de Vm : 65 et 112.
$Kds = 0{,}5.10^{-4}$; limites de Kds : — $0{,}6.10^{-4}$ et 2.10^{-4}.
$N = 28$.

La pente de la droite de régression n'est pas significativement différente de zéro.

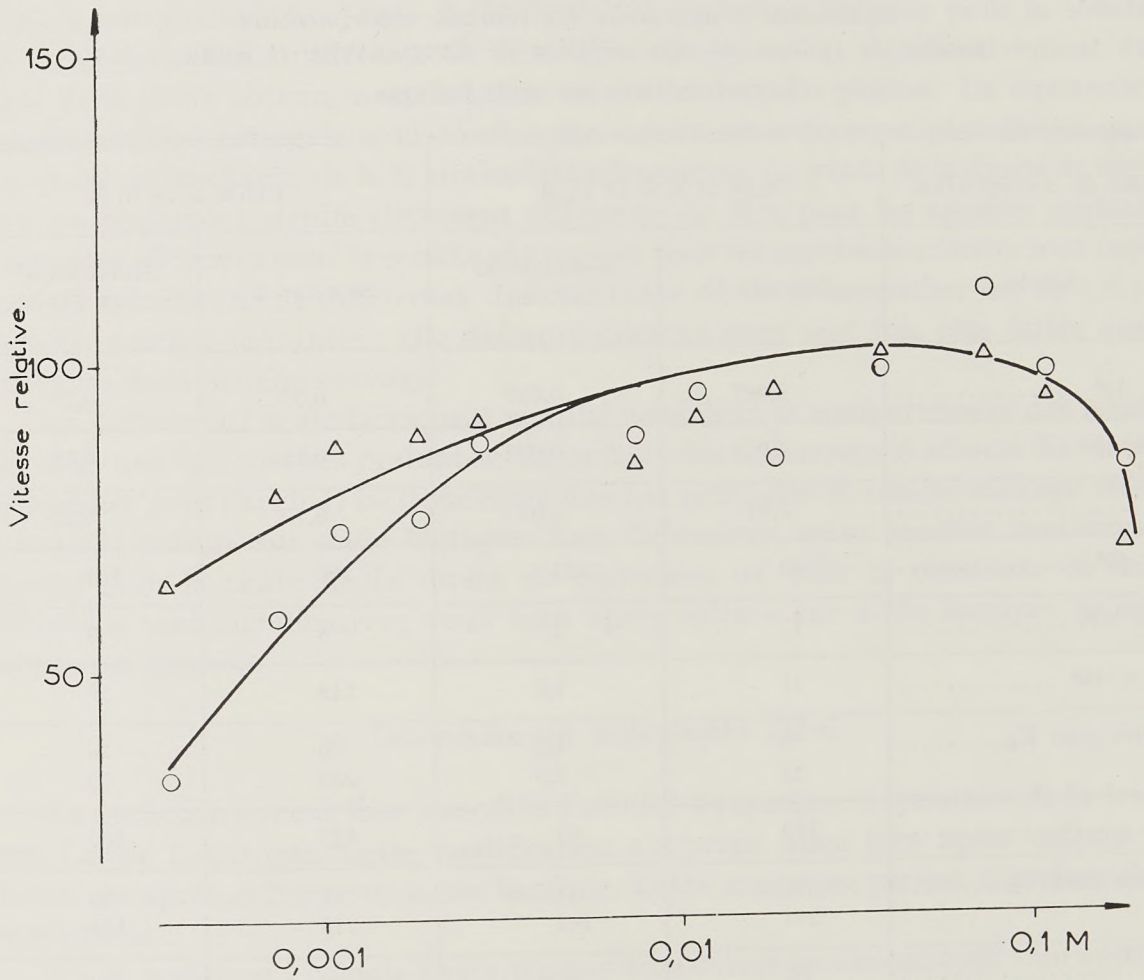


FIG. 20. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration en substrat*
Levure cultivée sur acide lactique
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide L-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse pour une concentration de 38 mM.
Cercles : souche sauvage 4.
Triangles : résultats groupés des souches mutantes 32 et 183.

La souche 214 n'était pas isogénique des souches 32 et 183 ; malgré ce, l'ajustement donne des résultats extrêmement voisins pour ces trois souches aussi bien pour la pente de la droite de régression que pour la constante de demi-saturation. Les mutations pl_1 (souche 32) et pl_5 (souche 183) semblent avoir le même mode d'action au niveau physiologique ; les souches portant les deux mutations présentent des caractéristiques identiques aux simples mutants et il n'y a pas d'effets d'additivité.

b) « *Affinité* » *pour l'acide L-lactique de la levure cultivée sur acide lactique*

L' « affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique a été mesurée également pour les souches sauvage (4) et mutantes (183 et 32) cultivées sur acide lactique. Les résultats obtenus pour les deux souches mutantes 32 et 183 ont été groupés.

TABLEAU 40

« Affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique. Ajustement à une droite des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK

Levure cultivée sur acide lactique

Zone de concentration	0,38 m M à 19 m M		19mM à 76 m M	
Souche	Sauvage 4	Mutantes 32 et 183	Sauvage 4	Mutantes 32 et 183
$b \times 10^4$	0,097	0,017	0,93	0,27
$S_b \times 10^4$	0,020	0,003	0,45	0,19
P	0,01	0,01	0,10	0,20
$a \times 10^4$	163	121	106	101
$S_a \times 10^4$	17	3	8	3
$K_{ds} \times 10^4$	11	1,6	119	29
Limites pour K_{ds}	5 22	1,3 1,9	9 333	— 10 79
V_m	109	94	127	107
Limites pour V_m	73 211	88 102	91 215	95 124
N	24	26	9	10

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression b et son écart-type Sb ; la probabilité P pour b de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre a et son écart-type Sa ; la constante de demi-saturation Kds et la vitesse maximum Vm ; les valeurs limites de ces deux paramètres Kds et Vm. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

Les vitesses de respiration, exprimées comme précédemment en pourcentage de la vitesse de respiration pour une concentration en substrat de 38 mM, sont représentées sur le graphique 20 en fonction du logarithme de la concentration. L'ajustement à une droite suivant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK a été effectué pour deux zones de concentrations (tabl. 40) :

0,38 mM à 19 mM et 19 mM à 76 mM.

Pour les concentrations comprises entre 76 mM et 190 mM, il y a une inhibition de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique par le substrat. Je ne reviendrai pas sur ce phénomène qui a été décrit pour la levure cultivée sur glucose.

Pour les concentrations comprises entre 19 et 76 mM les pentes ne sont pas significativement différentes de zéro. Le système respiratoire est donc saturé pour une concentration en acide L-lactique 19 mM. Ces résultats obtenus avec des levures cultivées sur acide lactique sont identiques à ceux qui avaient été obtenus avec des levures cultivées sur glucose.

Dans la zone de concentration comprise entre 0,38 mM et 19 mM, la levure cultivée sur acide lactique donne par contre des résultats assez différents de la levure cultivée sur glucose. La pente de la droite de régression obtenue pour la souche 4 est significativement différente de zéro. Elle est également significativement différente de la pente obtenue avec la même levure cultivée sur glucose. La constante de demi-saturation est égale à 11.10^{-4}; cette valeur est nettement plus élevée que la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase. La pente de la droite de régression est également significativement différente de zéro pour les souches mutantes. Les pentes obtenues pour la souche sauvage et pour les souches mutantes sont cependant significativement différentes. La constante de demi-saturation est de $1{,}6.10^{-4}$ pour les souches mutantes ; elle demeure donc environ sept fois plus faible que la constante de la souche sauvage.

La culture sur acide lactique a modifié aussi bien le comportement des souches sauvages que des souches mutantes. Cependant des différences d'affinité du système respiratoire pour l'acide L-lactique entre souches mutantes et souche sauvage subsistent après culture sur acide lactique. Les différences entre souches mutantes et sauvage pour la pente de la droite de régression ou pour la constante de demi-saturation sont significatives aussi bien après culture sur acide lactique qu'après culture sur glucose.

c) *Discussion du paragraphe* III-C

La mutation colonie lisse a modifié l'affinité du système respiratoire de la levure pour l'acide L-lactique. Cette modification s'exprime aussi bien après culture sur glucose qu'après culture sur acide lactique. Cette remarque permet d'exclure deux éventualités :

1°) la mutation « colonie lisse » n'a pas transformé en « constitutif » un système enzymatique qui serait adaptatif chez la souche sauvage.

2°) elle n'a pas provoqué l'apparition chez la souche mutante d'un système enzymatique de nature adaptative qui n'existerait pas chez la souche sauvage.

Examinons d'abord le comportement de la souche sauvage. Le système respiratoire est saturé par une concentration en acide L-lactique 19 mM. Dans la zone de

concentration comprise entre 0,38 et 19 mM, j'ai obtenu pour la levure cultivée sur glucose une constante de demi-saturation (3.10^{-4}M) égale à la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase (Slonimski, et Tysarowski' 1958). Le facteur limitant la vitesse de respiration de l'acide L-lactique est la teneur de la cellule en L-lacticodéshydrogénase (cf. chapitre IV, § II). Dans ces conditions, il est permis de penser que la courbe traduisant l'évolution de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en substrat correspond à l'action de cette enzyme sur l'acide L-lactique. Cette éventualité exige que la L-lacticodéshydrogénase soit située chez la souche sauvage dans une zone de la cellule ou l'acide L-lactique pénètre librement ; la diffusion de l'acide lactique dans cette zone s'effectuerait à la même vitesse que dans l'eau. On peut cependant objecter à cette hypothèse le fait que la zone de concentration prospectée (0,38 à 19 mM) est trop vaste pour correspondre à une réaction enzymatique. De plus, la levure sauvage cultivée sur acide lactique présente dans cette zone de concentration une constante de demi-saturation nettement plus élevée que la constante de Michaelis de l'enzyme.

Les souches mutantes ont un comportement tout à fait différent. Le système respiratoire des souches mutantes cultivées sur glucose, est saturé pour des concentrations en acide L-lactique inférieures à 0,38 mM. Il est intéressant de noter que la concentration saturante pour les souches mutantes *in vivo* est nettement plus faible que la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase. Un tel résultat pourrait s'expliquer par une modification de la structure de l'enzyme entraînant une affinité supérieure de l'enzyme pour son substrat ou par la présence d'un système de concentration. La culture sur acide lactique a modifié l'affinité du système respiratoire des souches mutantes pour l'acide L-lactique ; ces modifications pourraient être liées au fait que la teneur en L-lacticodéshydrogénase n'est plus le facteur limitant la vitesse de la respiration (cf. paragraphe II-B). En effet, les vitesses de respiration des acides L et D-lactiques 38 mM sont très voisines et il est permis de penser que le facteur limitant la vitesse est le même pour ces deux substrats. Cependant nous venons de voir que le système respiratoire de la levure est pratiquement saturé par l'acide L-lactique à la concentration 38 mM alors qu'il semble ne pas l'être à cette concentration par l'acide D-lactique chez la levure cultivée sur acide lactique. Dans ces conditions il est possible que la teneur en L-lacticodéshydrogénase constitue encore un facteur limitant de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique par la levure cultivée sur acide lactique, ces divers faits seront repris dans la discussion générale.

D. — Étude de l' « affinité » pour l'acide pyruvique

a) « *Affinité* » *pour l'acide pyruvique de la levure cultivée sur glucose*

L' « affinité » du système respiratoire pour l'acide pyruvique n'a été mesurée que pour la levure cultivée sur glucose. J'ai utilisé les mêmes protocoles expérimentaux que pour les acides L et D-lactiques. La figure 21 représente l'évolution de la vitesse v de respiration de l'acide pyruvique en fonction du logarithme de la concentration molaire en substrat. Chaque point du graphique représente la moyenne de plusieurs déterminations obtenues dans des expériences différentes. Comme pré-

cédemment la vitesse v de la respiration est exprimée en pourcentage de la vitesse de respiration pour une concentration en acide pyruvique 38 mM. Tous les calculs sont effectués sur les vitesses nettes après correction pour la respiration endogène.

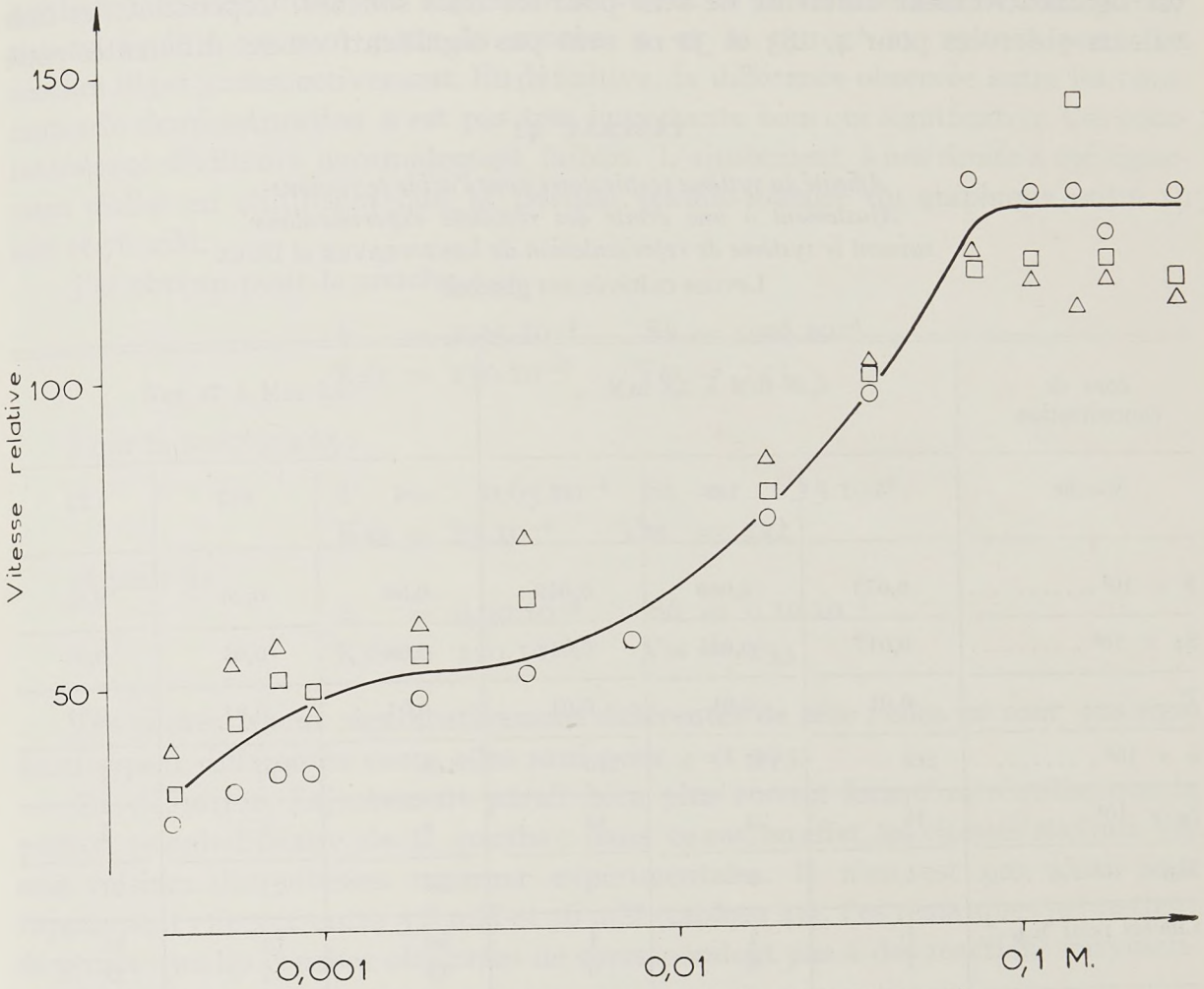


FIG. 21. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide pyruvique en fonction de la concentration en substrat*
Levure cultivée sur glucose
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide pyruvique exprimée en pourcentage de la vitesse pour une concentration de 38 mM.
Cercles : souche sauvage 4.
Triangles : souche mutante 183.
Carrés : souche mutante 32.

Le graphique 21 présente de nombreuses analogies avec le graphique 14. Les courbes obtenues pour les souches mutantes 183 et 32 et pour la souche sauvage 4 sont très voisines. Je n'ai tracé qu'une seule courbe pour les trois souches.

Nous pouvons distinguer trois zones :

1. — la zone comprise entre 0,38 mM et 3,8 mM semble correspondre à la deuxième partie d'une courbe de Michaelis ;

2. — la zone comprise entre 3,8 mM et 76 mM ressemble également à une courbe michaélienne ;

3. — au-delà de 76 mM, la vitesse devient sensiblement constante.

Ces résultats rappellent considérablement ceux qui avaient été obtenus pour l'acide D-lactique (graph. 14). La seule différence importante paraît être l'absence d'inhibition aux concentrations supérieures à 76 mM.

J'ai effectué les ajustements à une droite pour ces trois zones en utilisant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK (tabl. 41). Dans la zone de concentration comprise entre 0,38 mM et 3,8 mM la pente b de la droite de régression est significativement différente de zéro pour les trois souches. Cependant, les trois valeurs observées pour 4, 183 et 32 ne sont pas significativement différentes entre

TABLEAU 41

Affinité du système respiratoire pour l'acide pyruvique-
Ajustement à une droite des résultats expérimentaux
suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK
Levure cultivée sur glucose

Zone de concentration	0,38 mM à 3,8 mM			3,8 mM à 76 mM		
Souche	4	183	32	4	183	32
$b \times 10^4$	0,073	0,060	0,049	0,50	0,20	0,25
$S_b \times 10^4$	0,017	0,014	0,012	0,08	0,04	0,04
P	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$a \times 10^4$	266	197	210	138	110	117
$S_a \times 10^4$	14	23	10	8	4	4
$K_{ds} \times 10^4$	4	5	3	57	22	27
Limites pour K_{ds} ...	1 7	4 6	1 6	39 84	13 34	10 38
V_m	54	79	66	114	110	105
Limites pour V_m ...	66 162	50 191	54 83	91 151	98 125	95 119
N	38	25	23	37	27	24

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression b et son écart-type Sb ; la probabilité P pour b de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre a et son écart-type Sa ; la constante de demi-saturation Kds et la vitesse maximum Vm : les valeurs limites de ces deux paramètres Kds et Vm. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

elles. Les constantes de demi-saturation des trois souches sont très voisines. Ces constantes ne sont pas très différentes de celles trouvées dans la même zone de concentration avec les trois souches pour l'acide D-lactique et avec la souche sauvage pour l'acide L-lactique. Il n'est pas certain que la courbe étudiée dans cette zone de concentration soit réellement michaélienne ; de toute façon, elle n'est pas complète et nous n'en possédons que la deuxième partie. Il ne faut pas perdre de vue que les paramètres ainsi calculés n'ont qu'une simple valeur indicative.

Dans la 2e zone de concentration comprise entre 3,8 et 76 mM, j'ai trouvé pour les droites de régression des trois souches des pentes significativement différentes de zéro. La pente observée pour la souche 4 est significativement plus élevée que les pentes des droites de régression de 183 et de 32. La constante de demi-saturation est égale à 57.10^{-4} pour la souche 4 et à 23.10^{-4} et 27.10^{-4} pour les souches 183 et 32 respectivement. En définitive, la différence observée entre les constantes de demi-saturation n'est pas très importante bien que significative. Ces constantes sont d'ailleurs anormalement faibles. L'ajustement à une droite a été également réalisé en n'utilisant que la portion pseudo-linéaire du graphique entre 19 mM et 76 mM.

J'ai obtenu pour la souche 4 :

$$b = 1{,}05.10^{-4} \qquad Sb = 0{,}08.10^{-4}$$
$$Kds = 150.10^{-4} \qquad Vm = 143.$$

Pour la souche 183 :

$$b = 0{,}65.10^{-4} \qquad Sb = 0{,}15.10^{-4}$$
$$Kds = 83.10^{-4} \qquad Vm = 121 ;$$

et pour 32 :

$$b = 0{,}90.10^{-4} \qquad Sb = 0{,}10.10^{-4}$$
$$Kds = 120.10^{-4} \qquad Vm = 133$$

Les pentes b sont significativement différentes de zéro ; elles ne sont pas significativement différentes entre elles sauf pour 4 et 183.

En définitive, l'ajustement paraît bien plus correct lorsqu'on n'utilise que la portion pseudo-linéaire de la courbe ; dans ce cas, en effet, les vitesses maxima Vm sont voisines des vitesses maxima expérimentales. Il n'en est pas ainsi pour l'ajustement effectué entre 3,8 mM et 76 mM (tableau 41). Ces remarques permettent de penser que les courbes observées ne correspondent pas à des réactions enzymatiques simples.

Entre 76 mM et 190 mM, les pentes des droites de régression sont positives ou négatives suivant la souche ; mais dans les trois cas, ces pentes ne sont pas significativement différentes de zéro. La vitesse de la respiration de l'acide pyruvique est donc constante dans cette zone. La concentration saturante est, pour l'acide pyruvique 76 mM, comme pour l'acide D-lactique. Cependant, l'acide pyruvique ne donne pas, comme les deux acides lactiques, une inhibition de sa respiration pour les concentrations supérieures à 76 mM.

b) *Discussion du paragraphe* III-D

La mutation « colonie lisse » ne semble pas avoir apporté de modifications importantes dans l'« affinité » du système respiratoire pour l'acide pyruvique. Dans la zone de concentration 3,8-76 mM, la pente de la droite de régression est plus élevée pour 4 que pour les souches 183 et 32, mais ce fait ne modifie pas considérablement le phénomène. L'évolution de la vitesse de respiration de l'acide pyruvique en fonction de sa concentration suit une loi analogue à celle mise en évidence pour l'acide D-lactique. Tout se passe comme si nous nous trouvions en présence de deux réactions enzymatiques successives.

La première, pour les concentrations inférieures à 3,8 mM, est caractérisée par une vitesse maximum faible et par une affinité très élevée pour l'acide pyruvique. La constante de demi-saturation est égale à 4.10^{-4}. La deuxième correspond aux concentrations comprises entre 3,8 mM-76 mM ; elle est caractérisée par une vitesse

TABLEAU 42

Affinité du système respiratoire pour les acides pyruvique et D-lactique. Ajustement à une droite des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER *et* BURK

Levure cultivée sur glucose

Substrat	Acide D-lactique		Acide pyruvique	
Zone de concentration	0,38 à 3,8 mM	3,8 à 76 mM	0,38 à 3,8 mM	3,8 à 76 mM
$b \times 10^4$	0,029	0,28	0,062	0,35
$S_b \times 10^4$	0,010	0,04	0,011	0,04
P	0,01	0,01	0,01	0,01
$a \times 10^4$	204	125	231	124
$S_a \times 10^4$	8	3	10	4
$K_{ds} \times 10^4$	2	28	4	38
Limites pour K_{ds}	0,4 3	20 37	2 6	27 50
V_m	58	99	62	109
Limites pour V_m	50 70	91 109	52 78	98 125
N	53	54	86	88

Ce tableau donne les valeurs de la pente de la droite de régression b et son écart-type Sb ; la probabilité P pour b de ne pas être différent de zéro ; les valeurs du paramètre a et son écart-type Sa ; la constante de demi-saturation Kds et la vitesse maximum Vm ; les valeurs limites de ces deux paramètres Kds et Vm. Le nombre N des déterminations utilisées dans le calcul est également indiqué.

(Ces calculs ont été effectués sur l'ensemble des déterminations obtenues pour les souches 4, 32 et 183).

maximum élevée et par une faible affinité vis-à-vis du substrat. En utilisant l'ensemble des résultats expérimentaux, j'ai calculé pour cette « réaction » une vitesse maximum de 109 et une constante de demi-saturation de 38.10^{-4} (tabl. 42). Il est intéressant de comparer les valeurs de ces constantes de demi-saturation aux constantes de Michaelis de la carboxylase pyruvique (1.10^{-3} M) et de l'oxydase pyruvique (1.10^{-4} M). Il semble peu probable, en définitive, que la courbe correspondant à l'affinité du système respiratoire *in vivo* pour l'acide pyruvique ne dépende que des enzymes situées au début des chaînes de dégradation de ce substrat. Le facteur limi-

tant de la vitesse de respiration pourraît être identique pour les acides pyruvique et D-lactique, puisque les courbes obtenues pour ces deux substrats sont extrêmement voisines. Nous rejoignons ici les conclusions du paragraphe II-B.

Afin de comparer de façon plus précise le comportement de la levure vis-à-vis de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique, j'ai calculé les ajustements selon LINEWEAVER et BURK en rassemblant toutes les données que nous possédions pour les trois souches 4, 183 et 32 (tabl. 42).

Rappelons que la concentration 76 mM correspond à la concentration saturante dans le cas de l'acide pyruvique ; la vitesse de la respiration devient constante pour les concentrations supérieures à 76 mM. La concentration saturante en acide D lactique est également 76 mM ; une inhibition par le substrat se produit pour les concentrations supérieures. Aux concentrations inférieures à 76 mM, les résultats obtenus pour les acides pyruvique et D-lactique sont remarquablement voisins. Dans les deux cas, l'affinité du système respiratoire pour le substrat suit une loi compliquée correspondant à deux courbes successives d'apparence michaélienne.

Aux faibles concentrations (0,38 mM à 3,8 mM) une première réaction est caractérisée par une grande affinité pour le substrat et une faible vitesse maximum. Les pentes des droites de régression obtenues pour l'acide pyruvique et pour l'acide D-lactique sont du même ordre de grandeur ; cependant, les différences observées n'ont que 4 p. 100 de chance d'être dues au hasard. Les constantes de demi-saturation de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique sont voisines et ne sont pas significativement différentes. Aux concentrations comprises entre 3,8 et 76 mM une deuxième réaction est caractérisée par une forte vitesse maximum et une faible affinité pour le substrat. Les pentes des droites de régression obtenues pour les acides pyruvique et D-lactique ne sont pas significativement différentes ($P = 0,24$) ; il en est de même pour les constantes de demi-saturation et les vitesses maxima. Il n'est pas utile d'insister sur les anomalies obtenues dans ces ajustements ; les valeurs de Vm dans la 2e zone sont voisines des vitesses de respiration à 38 mM et sont donc nettement inférieures aux vitesses expérimentales maxima. De même, les constantes de demi-saturation sont anormalement faibles dans les deux zones. Les courbes que nous venons d'étudier ne correspondent peut-être pas à des réactions enzymatiques. De toute façon, il apparaît nettement à l'étude de ces résultats qu'un facteur commun limite la vitesse de la respiration des acides pyruvique et D-lactique.

La loi d'action de la concentration en acide pyruvique ou D-lactique sur la vitesse de leur respiration correspond assez bien à ce qui est observé lorsqu'on étudie l'évolution de la vitesse de respiration des tissus végétaux en fonction de la tension d'oxygène (DUCET, 1962). Nous avons observé en effet la succession de deux réactions caractérisées, la première par une faible vitesse maximum et une affinité pour le substrat relativement bonne, la deuxième par une vitesse maximum élevée et une affinité très faible pour le substrat. Cette loi d'action de la concentration sur la vitesse est, d'un point de vue formel, assez voisine de la courbe fournie par l'équation de la diffusion, dans une sphère, d'un substrat métabolisé à une vitesse constante. Cette analogie suggère que le facteur limitant la respiration des tissus végétaux aux faibles tensions d'oxygène pourrait être la diffusion intracellulaire (DUCET, 1962). Il est intéressant de comparer les courbes d'affinité obtenues pour les acides pyruvique et D-lactique avec la courbe donnée par l'équation de la diffusion dans une sphère d'un substrat métabolisé à une vitesse constante.

Rashevski (1960) a établi l'équation de la diffusion dans une sphère située dans un milieu liquide d'étendue infinie, lorsque la substance diffusible est transformée par une réaction de vitesse constante. La cellule de levure peut être considérée, en première approximation, comme une sphère de rayon R. L'équation de Rashevski peut être donc appliquée à condition que la concentration exogène en substrat soit plus élevée que la constante de Michaelis de la première enzyme de sa chaîne de dégradation, et que la réaction de dégradation soit d'ordre zéro. Dans le cas d'une réaction de vitesse constante, la solution générale de l'équation de diffusion pour une sphère s'écrit d'après Ducet :

$$C = \frac{Vm}{6D} r^2 + \frac{A}{r} + B.$$

— C est la concentration en substrat diffusible en tout point situé à une distance r du centre de la sphère.

— Vm est la vitesse maximum de la réaction enzymatique responsable de la disparition du substrat.

— D est le coefficient de diffusion du substrat dans le milieu.

— A et B sont des constantes.

Posons d'abord comme conditions limites C = Co à la surface de la cellule et $\frac{dc}{dr} = 0$ au centre. La constante A est néccessairement nulle car le rapport $\frac{1}{r}$ tend vers l'infini pour $r = 0$. La constante B est déterminée par la condition limite C = Co pour $r = R$: $B = Co - \frac{VmR^2}{6D}$.

L'équation devient alors :

$$C = Co - \frac{Vm}{6D} (R^2 - r^2)$$

Supposons maintenant que la vitesse de la réaction soit telle que tout le substrat soit utilisé avant d'avoir atteint le centre de la cellule. La valeur de B peut être encore calculée grâce à la condition C = Co pour $r = R$; l'équation générale s'écrit : $C = Co - \frac{Vm}{6D} (R^2 - r^2) - A\left(\frac{1}{R} - \frac{1}{r}\right)$.

La valeur de A n'est plus nulle ; elle peut être calculée par la nouvelle condition limite $\frac{dc}{dr} = 0$ pour $r = \Phi$. On appelle Φ le rayon de la sphère situé au centre de la cellule où le substrat ne pénètre pas. En dérivant l'équation, on obtient ;

$$\frac{dc}{dr} = \frac{Vm}{3D} r - A \frac{1}{r^2}$$

ce qui donne pour $\frac{dc}{dr} = 0$ et $r = \Phi$: $A = \frac{Vm}{3D} \Phi^3$.

En définitive, l'équation peut s'écrire (Peneloux et Ducet, 1963) :

$$C = C_0 - \frac{Vm}{6D} \left[(R^2 - r^2) + 2\Phi^3 \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{r}\right) \right].$$

La vitesse moyenne $\bar{v}$ de la réaction enzymatique dépend de la grandeur de la zone où le substrat ne pénètre plus.

Avec les mêmes conditions que précédemment, nous avons :

$$\bar{v} = Vm\left(1 - \frac{\Phi^3}{R^3}\right).$$

En posant $\frac{\Phi}{R} = x$, DUCET a obtenu les deux équations :

$$C_0 \frac{6D}{VmR^2} = 1 - 3x^2 + 2x^3. \qquad (1)$$

$$\bar{v} = Vm\,(1 - x^3). \qquad (2)$$

Lorsque $x = 0$, la cellule est entièrement envahie par le substrat et $\bar{v} = Vm$. Dans ces conditions, la concentration extérieure a pour valeur :

$$\frac{VmR^2}{6D}$$

c'est la concentration critique C_r au-dessous de laquelle la vitesse de la réaction diminue et au-dessus de laquelle la vitesse devient constante.

Dans le cas de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique, la concentration critique serait égale à 76 mM si le facteur limitant la réaction était bien la diffusion intracellulaire.

Ces acides ayant des concentrations critiques et des vitesses maxima de réaction analogues, nous pourrions déduire de l'équation

$$C_r = \frac{VmR^2}{6D} \qquad (3)$$

que leurs coefficients de diffusion sont très voisins.

Étudions la diffusion dans une sphère d'une substance dont la concentration critique est 76 mM. L'équation devient :

$$\frac{VmR^2}{6D} = 0{,}076.$$

En portant cettte valeur dans l'équation (1) nous obtenons :

$$13C_0 = 1 - 3x^2 + 2x^3 \qquad (4)$$

Nous pouvons calculer, pour diverses valeurs du paramètre x, les valeurs de C_0 grâce à l'équation (4). Pour ces mêmes valeurs de x, nous avons calculé $\frac{\bar{v}}{Vm}$ à l'aide de l'équation (2).

La figure 22 représente l'évolution de $100\,\frac{\bar{v}}{Vm}$ en fonction du logarithme de C_0. La courbe obtenue représente l'évolution de la vitesse d'une réaction en fonction du logarithme de la concentration exogène en substrat ; elle ne pose aucune condition sur la nature du substrat ni sur les dimensions de la sphère. La seule condition posée est que la concentration exogène saturante soit 76 mM.

Cette courbe théorique a été comparée aux résultats expérimentaux obtenus avec les acides D-lactique et pyruvique en utilisant un système de représentation analogue.

J'ai admis pour les acides pyruvique et D-lactique que la vitesse maximum V*m* était égale à la vitesse de la respiration pour une concentration exogène de 76 mM. Les vitesses de respiration ont été exprimées en pourcentage de la vitesse maximum. J'ai représenté, sur le graphique 22, les vitesses de respiration des acides pyruvique et D-lactique ; chaque point représente la moyenne de l'ensemble des déterminations effectuées sur les souches 4, 183 et 32. Les courbes obtenues pour les acides pyruvique et D-lactique, sont rigoureusement superposables ; elles sont de plus voisines de la

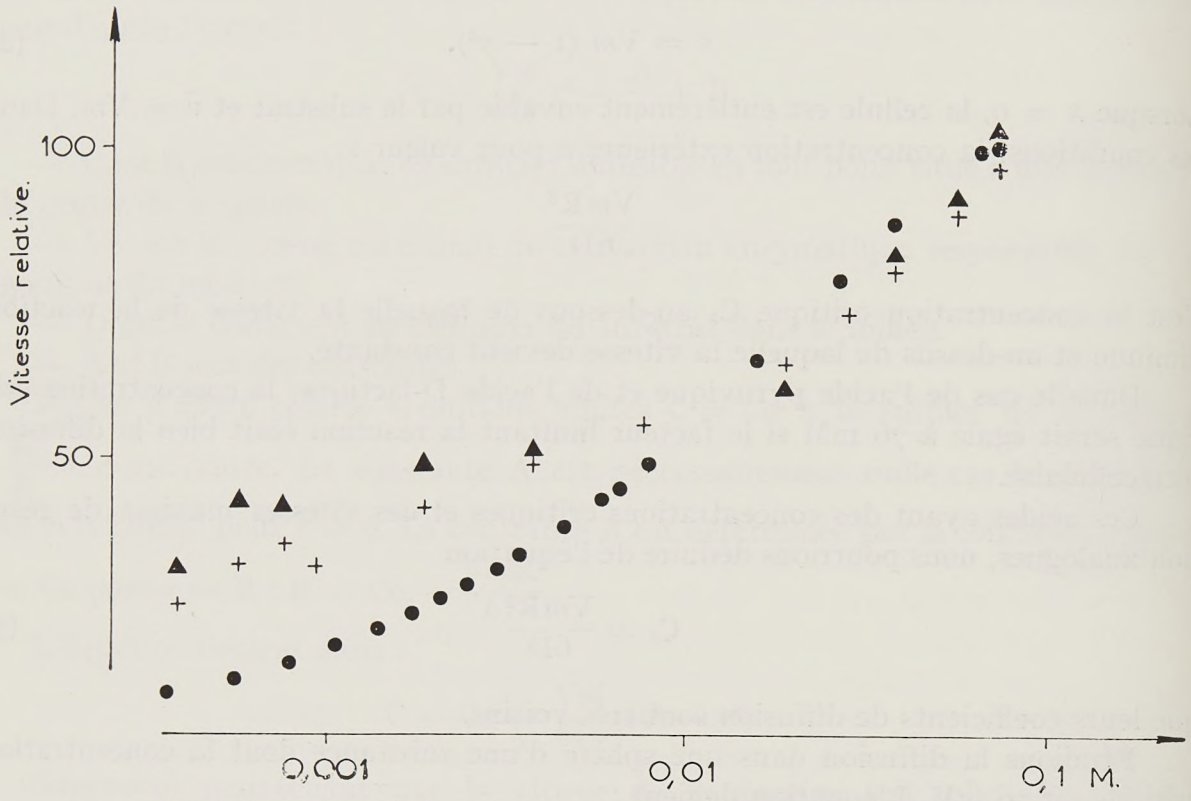


FIG. 22. — *Étude de l' « affinité » du système respiratoire pour les acides D-lactique et pyruvique*

Comparaison des courbes expérimentales à une courbe théorique représentant l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration dans le cas où le facteur limitant serait la diffusion dans une sphère, d'un substrat métabolisé avec une vitesse constante.

Levure cultivée sur glucose
En abscisse : concentration molaire exprimée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
Croix : acide pyruvique
Triangles : acide D-Lactique
Cercles : courbe théorique.
Les données des souches 4, 32 et 183 ont été groupées

courbe théorique représentant l'évolution de la vitesse lorsque le facteur limitant est la diffusion du substrat dans une sphère. Les courbes expérimentales et la courbe théorique sont très voisines aux concentrations les plus élevées ; elles sont par contre assez nettement différentes aux faibles concentrations inférieures à 3,8 mM. La loi d'action de la concentration sur la vitesse de la réaction correspond à l'équation de la diffusion dans une sphère ; en fait rien ne prouve que cette sphère soit la cellule entière. La sphère pourrait être une partie seulement de la cellule, par exemple les mitochondries ; la D-lacticodéshydrogénase et l'oxydase pyruvique sont en effet situées dans les mitochondries.

Le parallélisme entre la loi d'action de la concentration et l'équation de la diffusion dans une sphère d'un substrat métabolisé à une vitesse constante peut d'ailleurs être purement formel et ne suffit pas à prouver que la diffusion est le seul facteur limitant de la réaction. L'interprétation biologique sera discutée ultérieurement. Je n'ai voulu exposer ici que les faits expérimentaux et discuter leur interprétation mathématique.

IV. — Étude des interactions entre les acides L et D-lactiques

Au cours du paragraphe précédent, nous avons vu que le système respiratoire de la levure présentait des affinités différentes pour les acides L et D-lactiques. D'autre part, la mutation colonie lisse ne modifie que l'affinité pour l'acide L-lactique. Les voies métaboliques empruntées par les deux acides lactiques sont, au moins en partie, indépendantes. Il existe obligatoirement une partie commune (la cytochrome oxydase) et une partie différente (les lacticodéshydrogénases stéréospécifiques). Il est utile de savoir si les vitesses de ces oxydations sont limitées par les parties indépendantes ou par les parties communes des chaînes métaboliques impliquées dans le phénomène. Une manière simple d'aborder ce problème est de comparer les vitesses de respiration de l'acide D-lactique, de l'acide L-lactique et de l'acide D,L-lactique à une concentration identique, par exemple 38 mM. L'acide D, L-lactique utilisé dans ces expériences est un mélange en quantité égale d'acide L-lactique et d'acide D-lactique.

Les vitesses de respiration des acides D,L-lactique et D-lactique se sont révélées être toujours très voisines ; ces vitesses sont pratiquement égales chez la levure cultivée sur acide lactique Une différence légère a pu être observée dans le cas des levures cultivées sur glucose : la vitesse de respiration de l'acide D,L-lactique est légèrement plus faible que celle de l'acide D-lactique chez la souche sauvage alors qu'elle est légèrement plus élevée chez les souches mutantes. Ces observations permettent de tirer quelques conclusions. Les deux chaînes métaboliques responsables de la respiration des acides L-lactique et D-lactique sont extrêmement peu indépendantes. En effet, s'il y avait indépendance totale, la vitesse de respiration de l'acide D,L-lactique serait très nettement supérieure à la plus élevée des vitesses de respiration des deux stéréoisomères.

De plus, il convient de rappeler que le système respiratoire de la levure n'est saturé qu'à partir d'une concentration en acide D-lactique 76 mM ; ainsi, la vitesse de la respiration de l'acide D,L-lactique 38 mM ne dépasse jamais celle de l'acide D-lactique 76 mM. Le système respiratoire de la levure n'est pas saturé par l'acide D,L-lactique 38 mM. Il semble donc qu'une compétition se produise entre les deux acides L et D-lactiques à un niveau qui reste à déterminer.

V. — Étude de la L-lacticodéshydrogénase

Nous avons vu au paragraphe précédent que la mutation colonie lisse a pour conséquence une meilleure « affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique *in vivo*. J'ai donc étudié l'affinité de l'enzyme responsable de la déshydrogénation

de l'acide L-lactique pour son substrat. Les propriétés de la L-lacticodéshydrogénase extraite d'une souche sauvage (n° 4) et d'une souche mutante (n° 183) ont été comparées.

Pour cette étude, les levures sont cultivées sur milieu synthétique à base de glucose et prélevées à la fin de la phase de croissance exponentielle. Les cultures avaient atteint 91.10^6 cellules par ml pour la souche 4 et 71.10^6/ml pour la souche 183 au moment de leur prélèvement. Dans les deux cas, j'ai prélevé 500 ml de culture. Le broyage a été effectué au Nossal suivant une technique précédemment décrite (Somlo, 1962). La détermination du Km de l'enzyme a été effectuée sur l'extrait brut en utilisant une gamme de concentration en acide L-lactique comprise entre 2 et $12{,}5.10^{-4}$ M. Les mesures ont été faites à 550 mμ au spectrophotomètre Beckman avec des cuves contenant pour 1 ml : tampon phosphate pH = 7,2 0,2 M : 65 μl ; azoture de Na 3.10^{-2} M, 100μl ; versenne 0,1 M : 10 μl ; cytochrome C n° 2 Sigma 20 mg/ml 7.10^{-5} M forme oxydée : 65 μl ; acide lactique ; broyat ; eau ; q. s. p./ 1 ml.

Les mesures ont été faites en utilisant 20 μl de broyat dans chaque cuve de mesure pour la souche 4 et 30 μl pour la souche 183. Tous les calculs ont été effectués sur les résultats bruts des mesures exprimées en unité Beckman/minute (UB). J'ai mesuré la variation de l'absorption à 550 mμ entre 30 s et 1 mn 30 s et j'ai corrigé toutes les déterminations effectuées pour l'activité du broyat en l'absence de substrat. J'ai ensuite présenté les résultats en effectuant l'ajustement de Lineweaver et Burk :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vm} + \frac{Km}{Vm} \cdot \frac{1}{S}.$$

Le graphique 23 indique les résultats obtenus pour les souches 4 et 183. Les droites de régression ont été calculées. Il a été ainsi trouvé pour la constante de Michaelis des valeurs de :

$3{,}4.10^{-4}$ M pour la souche 4, et de $3{,}8.10^{-4}$ M pour la souche 183.

Le même calcul permet d'obtenir la vitesse maximum de la réaction : 70 UB/minute pour 20 μl de broyat dans le cas de la souche 4 ; 75 UB/minute pour 30 μl de broyat dans le cas de la souche 183. Il est possible de ramener cette mesure de l'activité du broyat à la quantité de levure utilisée pour l'obtenir. J'ai obtenu ainsi : 0,62 unité Beckman/minute par million de cellules pour la souche 4 et 0,57 unité Beckman/minute par million de cellules pour la souche 183.

Naturellement ces valeurs ne constituent pas une mesure de la teneur en L-lacticodéshydrogénase des levures car elles dépendent beaucoup des taux d'extractions. Elles permettent cependant une comparaison des souches et montrent que les teneurs en enzyme des souches sauvages et des souches mutantes sont comparables.

En définitive, l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas modifiée par la mutation. La constante de Michaelis de la L-lactico-cytochrome C déshydrogénase est identique pour les deux souches étudiées ; la valeur trouvée dans cette expérience est très voisine de celle trouvée précédemment par d'autres auteurs (Boeri et *al.*, 1955 ; Appleby, et Morton, 1954 ; Slonimski, et Tysarowski, 1958).

Il est donc permis de penser que la mutation ne porte pas sur la structure et les propriétés de cette enzyme. Les résultats du paragraphe précédent montrent que l'affinité du système respiratoire *in vivo* pour l'acide L-lactique est augmentée consi-

dérablement ; la modification observée devrait porter logiquement sur la première enzyme de dégradation de l'acide L-lactique, la L-lacticodéshydrogénase, qui est en outre le facteur limitant la vitesse de la respiration au niveau enzymatique (cf. chapitre IV, § II). Nous voyons ici que les gènes *pl*/PL ne contrôlent apparemment ni la structure ni la biosynthèse de la L-lacticodéshydrogénase.

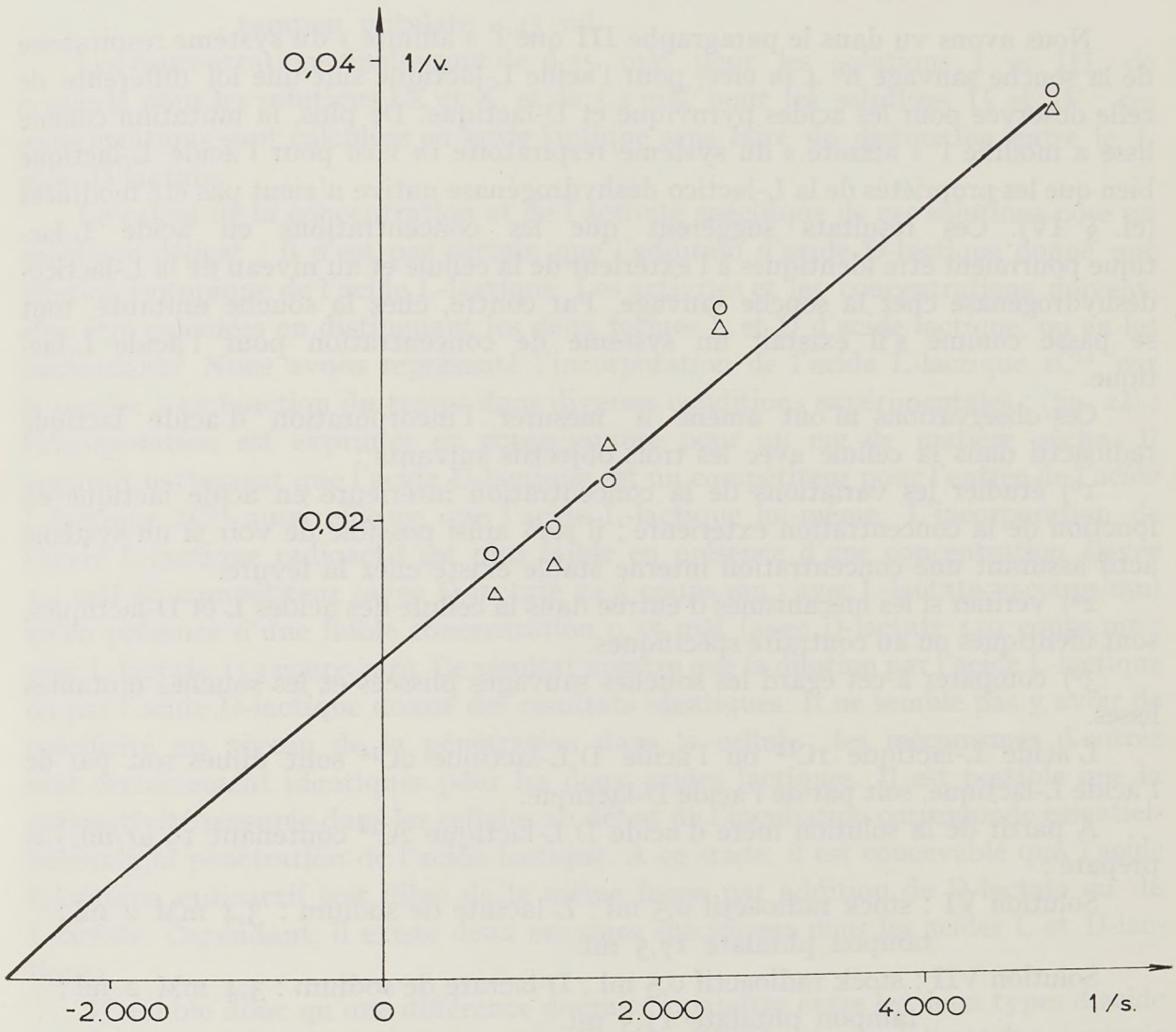


FIG. 23. — *Comparaison des constantes de* Michealis *de la L-lactico-déshydrogénase des souches sauvage et mutante*

Levure cultivée sur glucose
En abscisse : inverse de la concentration molaire en acide L-lactique.
En ordonnée : inverse de la vitesse de la réaction.

Cercles : souche sauvage 4.
Triangles : souche mutante 183.

Ce n'est donc pas l'enzyme elle-même qui est modifiée par la mutation mais les conditions de son fonctionnement dans la cellule. Les résultats observés pourraient s'expliquer par exemple par la présence d'un système de concentration spécifique de l'acide L-lactique chez la souche mutante. Le paragraphe V sera consacré à l'étude du mécanisme d'entrée de l'acide lactique dans la levure.

VI. — Étude de l'incorporation de l'acide lactique radioactif

A. — Introduction

Nous avons vu dans le paragraphe III que l' « affinité » du système respiratoire de la souche sauvage n° 4 *in vivo*, pour l'acide L-lactique suit une loi différente de celle observée pour les acides pyruvique et D-lactique. De plus, la mutation colonie lisse a modifié l' « affinité » du système respiratoire *in vivo* pour l'acide L-lactique bien que les propriétés de la L-lactico déshydrogénase native n'aient pas été modifiées (cf. § IV). Ces résultats suggèrent que les concentrations en acide L-lactique pourraient être identiques à l'extérieur de la cellule et au niveau de la L-lactico-déshydrogénase chez la souche sauvage. Par contre, chez la souche mutante, tout se passe comme s'il existait un système de concentration pour l'acide L-lactique.

Ces observations m'ont amené à mesurer l'incorporation d'acide lactique radioactif dans la cellule avec les trois objectifs suivants :

1°) étudier les variations de la concentration intérieure en acide lactique en fonction de la concentration extérieure ; il sera ainsi possible de voir si un système actif assurant une concentration interne stable existe chez la levure.

2°) vérifier si les mécanismes d'entrée dans la cellule des acides L et D-lactiques, sont identiques ou au contraire spécifiques.

3°) comparer à cet égard les souches sauvages plissées et les souches mutantes lisses.

L'acide L-lactique $1C^{14}$ ou l'acide D,L-lactique $2C^{14}$ sont dilués soit par de l'acide L-lactique, soit par de l'acide D-lactique.

A partir de la solution mère d'acide D,L-lactique $2C^{14}$ contenant 19 μc/ml, j'ai préparé :

Solution VI : stock radioactif 0,5 ml ; L-lactate de sodium : 3,4 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,5 ml.

Solution VII : stock radioactif 0,5 ml ; D-lactate de sodium : 3,4 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,5 ml.

Solution VIII : stock radioactif 0,5 ml ; tampon phtalate 19,5 ml. «

Chaque flacon d'expérience reçoit 0,9 ml de solution radioactive et 0,1 ml d'une suspension de levure dans le tampon phosphate M/15 pH = 4,5. Dans ces conditions, les concentrations finales sont de 0,39 mM pour les solutions VI et VII et de 0,083 mM pour VIII ; ces concentrations sont calculées en acide lactique sans distinguer le L et le D-lactate.

La solution-mère d'acide L-lactique $1C^{14}$ contenant 5 μc/ml a servi à préparer :

Solution I : stock radioactif 0,2 ml ; L-lactate de sodium : 3,4 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,6 ml.

Solution II : stock radioactif 0,2 ml ; L-lactate de sodium : 34 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,6 ml.

Solution III : stock radioactif 0,2 ml ; D-lactate de sodium : 3,4 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,6 ml.

Solution IV : stock radioactif 0,2 ml ; D-lactate de sodium : 34 mM 2 ml ; tampon phtalate 17,6 ml.

Solution V : stock radioactif 0,2 ml ; tampon phtalate 19,6 ml.

Solution IX : stock radioactif 0,5 ml ; L-lactate de sodium : 34 mM 0,05 ml ; tampon phtalate 4,45 ml.

Solution X : stock radioactif 0,5 ml ; D-lactate de sodium : 34 mM 0,05 ml ; tampon phtalate 4,45 ml.

Les concentrations finales sont de 0,35 mM pour les solutions I et III, de 0,39 mM pour les solutions IX et X, et de 3,4 mM pour les solutions II et IV ; ces concentrations sont calculées en acide lactique sans faire de distinction entre le L et le D-lactate.

Le calcul de la concentration et de l'activité spécifique de ces solutions pose un probléme délicat : il n'est pas certain que l'addition d'acide D-lactique donne une dilution isotopique de l'acide L-lactique. Les activités et les concentrations doivent-elles être calculées en distinguant les deux formes L et D d'acide lactique, ou en les confondant ? Nous avons représenté l'incorporation de l'acide L-lactique $1C^{14}$ par la souche 4 en fonction du temps dans diverses conditions expérimentales ; (fig. 24) ; l'incorporation est exprimée en coups/minute pour un mg de matière sèche. Il apparaît nettement que l'acide D-lactique est un compétiteur pour l'entrée de l'acide L-lactique $1C^{14}$ aussi efficace que l'acide L-lactique lui-même. L'incorporation de l'acide L-lactique radioactif est plus faible en présence d'une concentration élevée 3,4 mM en compétiteur (avec D-lactate 24,5 coups/mn ; avec L-lactate 39 coups/mn) qu'en présence d'une faible concentration 0,35 mM (avec D-lactate 119 coups/mn ; avec L-lactate 153 coups/mn). Ce résultat montre que la dilution par l'acide L-lactique ou par l'acide D-lactique donne des résultats identiques. Il ne semble pas y avoir de spécificité au niveau de la pénétration dans la cellule ; les mécanismes d'entrée sont certainement identiques pour les deux acides lactiques. Il est possible que la radioactivité mesurée dans les cellules au début de l'incubation corresponde essentiellement à la pénétration de l'acide lactique. A ce stade, il est concevable que l'acide L-lactique radioactif soit dilué de la même façon par addition de D-lactate ou de L-lactate. Cependant, il existe deux enzymes spécifiques pour les acides L et D-lactiques.

Il semble donc qu'une différence devrait apparaître entre les deux types d'acide lactique. Lorsque l'incubation se prolonge, les acides lactiques doivent être intégrés partiellement dans les substances de réserves ; la présence de deux déshydrogénases spécifiques devrait se manifester à ce moment. Le stockage de la radioactivité dans les réserves devrait être différent suivant que l'acide lactique radioactif a été dilué par l'acide D-lactique ou par l'acide L-lactique. Après une incubation de 20 mn, au contraire, l'incorporation de la radioactivité dans les cellules ne dépend pas de l'acide lactique (L ou D) utilisé pour les dilutions. Il existe donc un mécanisme qui empêche la spécificité d'apparaître.

A l'intérieur de la levure, l'acide L-lactique radioactif pourrait être dilué par l'acide D-lactique grâce à un équilibre entre les deux réactions :

$$\text{acide L-lactique} \rightleftarrows \text{acide pyruvique} \rightleftarrows \text{acide D-lactique}$$

Un tel mécanisme est peu probable car la réversibilité de ces deux réactions

enzymatiques est très faible. Contrairement aux lacticodéshydrogénases liées au DPN, la L et la D-lacticodéshydrogénases de la levure donnent un équilibre peu réversible tendant à transformer la quasi-totalité de l'acide lactique en acide pyruvique (LABEYRIE, SLONIMSKI, NASLIN, 1959). Dans les conditions où nous avons opéré, les deux lactico déshydrogénases ne sont pas saturées par le substrat.

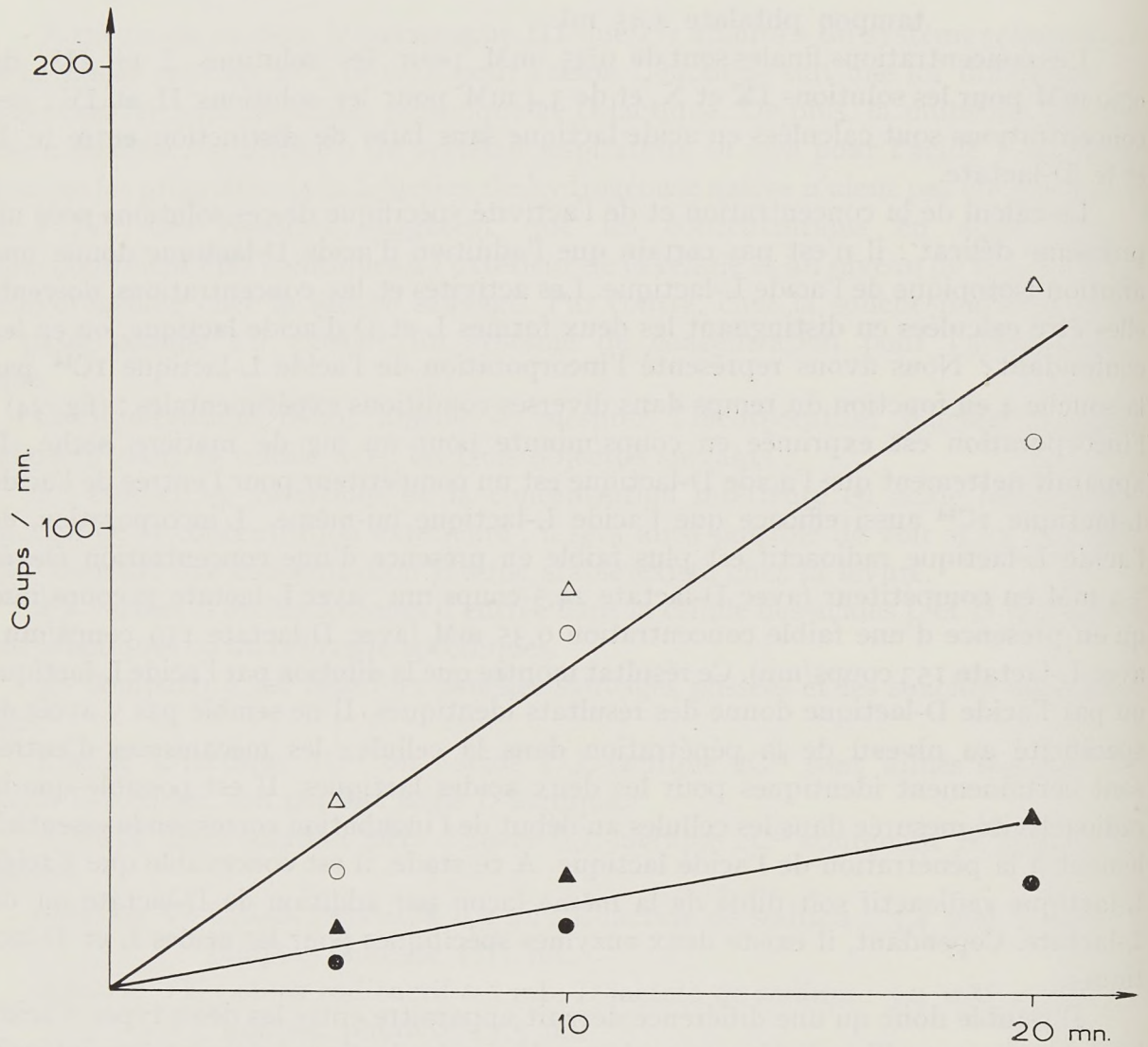


FIG. 24 — *Cinétique d'incorporation de l'acide lactique* $1C^{14}$
Souche n° 4

En abscisse : temps en minutes.
En ordonnée : nombre de coups/minutes incorporés par mg de matière sèche.

Cercles : D-lactate 0,35 mM.
Cercles pleins : D-lactate 3,4 mM.
Triangles : L-lactate 0,35 mM.
Triangles pleins : L-lactate 3,4 mM.

Il est possible que la destruction de l'acide lactique soit très rapide à l'intérieur de la cellule. Il ne faut pas perdre de vue également que les deux acides lactiques ne sont que faiblement incorporés dans les synthèses (< 20 p. 100). Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que l'incorporation globale mesurée ne dépende que très faiblement de la nature du compétiteur L ou D-lactate pendant toute la durée de la mesure. Au cours de l'exposé qui va suivre, j'ai exprimé l'incorporation en mμ molécules absorbées par mg de matière sèche.

Les calculs de l'activité spécifique de l'acide lactique dans les solutions d'expérience et de l'incorporation dans les cellules, ont été conduits en appliquant le même facteur de dilution pour l'acide L-lactique dilué par le L-lactate et pour l'acide L-lactique dilué par le D-lactate.

B. — Étude de la souche 4

Une culture de la souche 4 sur milieu synthétique glucosé en fin de croissance exponentielle a donné une suspension dans le tampon phosphate à 16. mg matière sèche/ml. La levure présente les coefficients métaboliques suivants mesurés entre 0 et 15 mn : Q_{O_2} endogène : 7 ; Q_{CO_2} endogène : 8 ; Q_{O_2} L-lactate (0,38 mM) : 30 ; Q_{CO_2} L-lactate (0,38 mM) : 25 ; Q_{O_2} D-lactate (0,38 mM) : 24 ; Q_{CO_2} D-lactate (0,38 mM) : 26.

TABLEAU 43

Incorporation de l'acide lactique

Solutions n°	VI		VII		VIII		IX	X
Temps d'incubation ..	5	10	5	10	5	10	10	10
Incorporation souche 4	11	11	12	12	3	4	0,5	1
Incorporation souche 183	14,5	15,5	14	15,5	3	4	1,5	1

Le temps d'incubation est exprimé en minutes ; les incorporations en mμ molécules par mg de matière sèche.
Les valeurs indiquées dans le tableau sont corrigées pour l'incorporation au temps 0.
Pour la composition des solutions d'expérience voir le texte § VI-A ; les solutions VI, VII et VIII contiennent de l'acide D, L-lactique 2 C^{14} tandis que les solutions IX et X sont marquées par l'acide L-lactique 1 C^{14}.

En mesurant ces coefficients métaboliques avec une concentration en acide lactique voisine de celle utilisée dans les expériences d'incorporation on peut estimer la respiration dans les divers flacons d'expérience et tenter un bilan de l'utilisation de l'acide lactique. Le tableau 43 donne l'incorporation exprimée en mμ molécules d'acide lactique/mg de matière sèche sans avoir distingué dans les calculs les acides L et D-lactiques ; il indique les incorporations après 5 mn et 10 mn d'incubation en corrigeant des valeurs trouvées au temps zéro (cf. première partie ; § VI-B).

Avec l'acide lactique 2C^{14}, je n'ai pas observé d'augmentation de radioactivité entre 5 et 10 mn (cf. fig. n° 25A ; tabl. 43). La saturation du système semble être obtenue très rapidement. Le graphique n° 26A montre qu'il y a proportionnalité entre incorporation et concentration extérieure.

Ces résultats permettent de mettre en évidence deux faits importants :

1. — l'incorporation d'acide lactique radioactif dans la cellule varie en fonction de la concentration extérieure ;

2. — l'incorporation ne dépend pas de la nature du compétiteur utilisé pour diluer l'acide radioactif : acide L ou acide D-lactique.

Il faut noter d'autre part que l'incorporation de l'acide marqué sur le 2e carbone est beaucoup plus importante que celle de l'acide marqué sur le carboxyle (tabl. 43). Cette observation appelle une discussion car elle peut fournir des renseignements sur l'utilisation de l'acide lactique par la cellule.

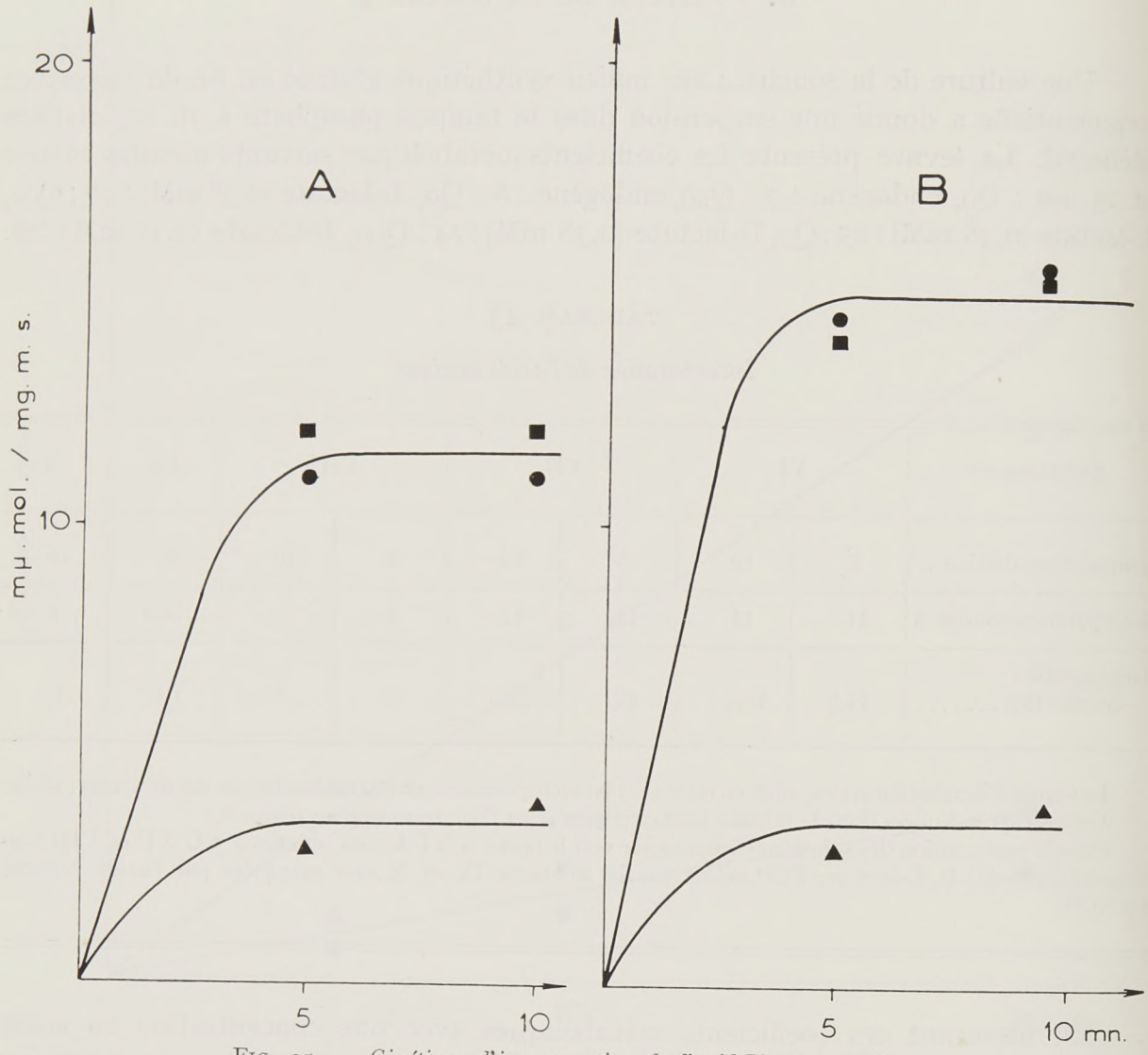


FIG. 25. — *Cinétique d'incorporation de l'acide lactique 2C¹⁴*
En abscisse : temps exprimé en minutes.
En ordonnée : incorporation en mμ molécules par mg de matière sèche.
A — Souche 4.
B — Souche 183.

Cercles : solution VI.
Carrés : solution VII.
Triangles : solution VIII.

En effet, l'acide lactique peut se trouver sous différentes formes après son entrée dans la cellule :

1. — acide lactique libre,

2. — acide pyruvique ou produits de synthèse qui en dérivent,

3. — éthanal libre ou plus probablement incorporé dans le cycle de Krebs et les produits de synthèse qui en dérivent,

4. — gaz carbonique et eau après oxydation complète.

Pour une partie de l'acide lactique, il n'est pas exclu que le 3e carbone puisse être incorporé dans les réserves alors que les 1er et 2e donnent du gaz carbonique. En première approximation, on négligera ce cas dans les calculs. L'incorporation de lactate $1C^{14}$ donne la portion d'acide lactique se trouvant sous les formes 1 et 2. L'incorporation du lactate $2C^{14}$ mesure la somme des formes 1 + 2 + 3. Enfin

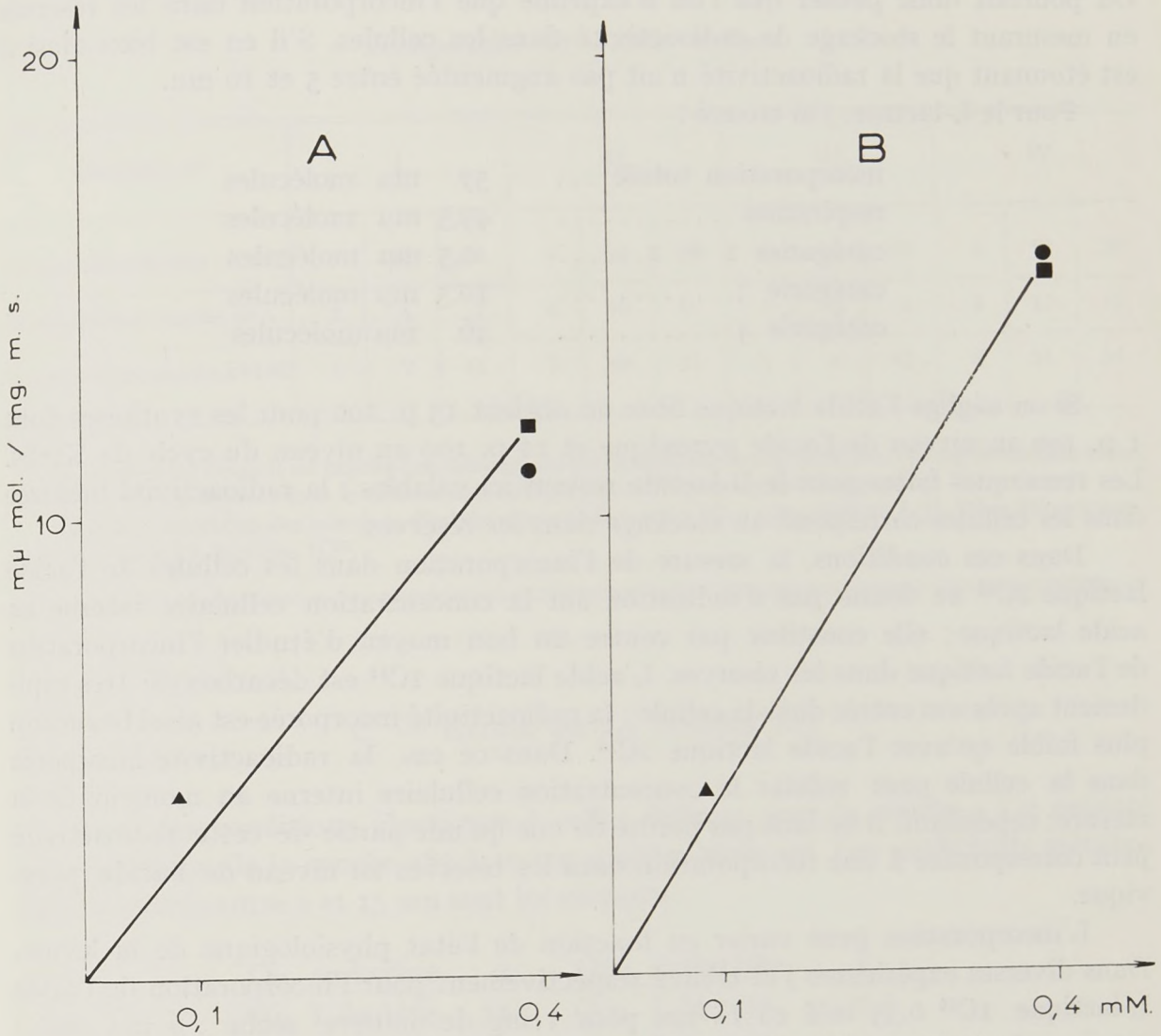


FIG. 26. — *Incorporation de l'acide lactique $2C^{14}$ en fonction de la concentration*

En abscisse : concentration milli-molaire.
En ordonnée : incorporation en mμ molécules par mg de matière sèche.
A : souche 4
B : souche 183.

Cercles : solution VI.
Carrés : solution VII.
Triangles : solution VIII.

l'intensité de la respiration permet de calculer la forme 4 à condition de tenir compte de la décarboxylation de l'acide lactique de la catégorie 3.

J'ai trouvé dans cette expérience pour l'acide D-lactique :

incorporation totale..	51 mμ molécules
respiration	43 mμ molécules
catégories 1 + 2	1 mμ molécules
catégorie 3	11 mμ molécules
catégorie 4	39 mμ molécules

Ces résultats sont exprimés en mμ molécules par mg de matière sèche pour 10 mn. Si on néglige l'acide lactique libre on obtient le chiffre de 16 p. 100 pour l'incorporation dans les synthèses ; soit 2 p. 100 au niveau de l'acide pyruvique et 14 p. 100 au niveau du cycle de Krebs. Ce chiffre d'incorporation dans les synthèses est légèrement plus faible que celui trouvé par d'autres méthodes (cf. chapitre IV, § IIA). On pourrait donc penser que l'on n'exprime que l'incorporation dans les réserves en mesurant le stockage de radioactivité dans les cellules. S'il en est bien ainsi il est étonnant que la radioactivité n'ait pas augmentée entre 5 et 10 mn.

Pour le L-lactate, j'ai trouvé :

incorporation totale....	57 mμ molécules
respiration.....	49,5 mμ molécules
catégories 1 + 2.....	0,5 mμ molécules
catégorie 3.....	10,5 mμ molécules
catégorie 4.....	46 mμ molécules

Si on néglige l'acide lactique libre on obtient 13 p. 100 pour les synthèses dont 1 p. 100 au niveau de l'acide pyruvique et 12 p. 100 au niveau du cycle de Krebs. Les remarques faites pour le D-lactate restent ici valables ; la radioactivité mesurée dans les cellules correspond au stockage dans les réserves.

Dans ces conditions, la mesure de l'incorporation dans les cellules de l'acide lactique $2C^{14}$ ne donne pas d'indication sur la concentration cellulaire interne en acide lactique ; elle constitue par contre un bon moyen d'étudier l'incorporation de l'acide lactique dans les réserves. L'acide lactique $1C^{14}$ est décarboxylé très rapidement après son entrée dans la cellule ; la radioactivité incorporée est ainsi beaucoup plus faible qu'avec l'acide lactique $2C^{14}$. Dans ce cas, la radioactivité incorporée dans la cellule peut refléter la concentration cellulaire interne au moment de la mesure ; cependant, il ne faut pas perdre de vue qu'une partie de cette radioactivité peut correspondre à une incorporation dans les réserves au niveau de l'acide pyruvique.

L'incorporation peut varier en fonction de l'état physiologique de la levure. Dans diverses expériences j'ai trouvé respectivement pour l'incorporation de l'acide L-lactique $1C^{14}$ 0,35 mM en 10 mn pour 1 mg de matière sèche : 6 mμ mol. ; 3,5 mμmol. ; 0,5 mμ mol. Chaque fois que la comparaison a été faite la nature du compétiteur (L ou D-lactate) n'a pas modifié l'entrée.

L'incorporation de l'acide L-lactique $1C^{14}$ dilué avec de l'acide L-lactique ou avec de l'acide D-lactique comme compétiteur, a été également étudiée avec des concentrations dix fois plus fortes. Dans cette expérience j'ai utilisé les solutions n^{os} I, II, III et IV. Il y a proportionnalité en fonction du temps pour les faibles concentrations 0,35 mM pendant 20 mn et saturation en 10 mn pour des concentrations de 3,4 mM. Il n'y a pas proportionnalité absorption/concentration externe. Aux deux concentrations, le résultat est identique pour les 2 compétiteurs L et D lactate (tabl. 44).

En résumé, l'incorporation des acides L et D-lactiques s'effectue de façon identique. L'acide lactique est respiré à mesure de son entrée dans la cellule ; la radioactivité présente dans la cellule correspond sensiblement à la portion de l'acide absorbé qui est normalement retenu dans les réserves après 10 mn d'incubation

dans l'acide lactique 0,35 mM. L'incorporation dans les réserves doit se faire essentiellement au niveau du cycle de Krebs, c'est-à-dire après décarboxylation de l'acide lactique.

TABLEAU 44

Incorporation de l'acide lactique

Solutions n°	I			II			III			IV		
Temps d'incubation	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Incorporation souche n° 4	2	4	7	6	10	14	1	3	5	3	12	12
Incorporation souche n° 183	4	7	11	7	10	14	3	8	12	5	21	51

Le temps d'incubation est exprimé en minutes, les incorporations en mμ molécules par mg de matière sèche.
Les valeurs indiquées dans le tableau sont corrigées pour l'incorporation au temps 0.
Pour la composition des solutions d'expérience voir le texte § VI-A ; les solutions I, II, III et IV sont marquées par l'acide L-lactique $1C^{14}$.

C. — Étude de la souche 183

Avec des conditions identiques à celles définies pour la souche 4 j'ai préparé une suspension de la souche 183 à 19 mg matière sèche/ml. Les coefficients métaboliques mesurés entre 0 et 15 mn sont les suivants :

Q_{O_2} endogène : 9 ; Q_{CO_2} endogène : 7
Q_{O_2} L-lactate : 31 ; Q_{CO_2} L-lactate : 27,5
Q_{O_2} D-lactate : 32 ; Q_{CO_2} D-lactate : 29.

Ces divers coefficients ont été mesurés pour une concentration en acide lactique de 0,38 mM. Je donne dans le tableau 43 l'incorporation exprimée en mμ M d'acide lactique/mg de matière sèche sans distinguer les acides D et L-lactiques dans les calculs.

La saturation semble obtenue très vite puisqu'il n'y a pas d'augmentation de l'incorporation entre 5 et 10 mn (fig. 25B).

Il y a, par contre, proportionnalité entre absorption et concentration externe (fig. 26B). Comme pour la souche 4, l'incorporation est indépendante de la nature du compétiteur (L ou D-lactate). Enfin l'incorporation de l'acide marqué sur le 2e carbone est beaucoup plus importante que celle de l'acide marqué sur le carboxyle. En effectuant un essai de bilan par les mêmes procédés que précédemment on trouve pour l'acide D-lactique :

incorporation totale :	66 mμ molécules/mg m. s./10 mn
respiration	56 mμ molécules/mg m. s./10 mn
catégories 1 + 2.	1 mμ molécules/mg m. s./10 mn
catégorie 3	14 mμ molécules/mg m. s./10 mn
catégorie 4	51 mμ molécules/mg m. s./10 mn

Si on néglige la présence d'acide lactique (catégorie 1) on trouve 16 p. 100 pour l'incorporation dans les synthèses ; c'est-à-dire 1,5 p. 100 au niveau acide pyruvique et 14,5 p. 100 après décarboxylation. Ces résultats correspondent au pourcentage habituel d'incorporation dans les synthèses de l'acide lactique.

Pour le L-lactate j'ai trouvé :

incorporation totale :	63 mμ molécules/mg m. s.
respiration.....	52 mμ molécules/mg m. s.
catégories 1 + 2..	1,5 mμ molécules/mg m. s.
catégorie 3.....	14,5 mμ molécules/mg m. s.
catégorie 4.....	47 mμ molécules/mg m. s.

En négligeant l'acide lactique libre on obtient 17,5 p. 100 pour l'incorporation dans les synthèses dont 2,5 p. 100 au niveau acide pyruvique et 15 p. 100 après décarboxylation.

L'incorporation de l'acide L-lactique $1C^{14}$ a été étudiée pour des concentrations plus élevées de compétiteurs (L et D-lactate). J'ai utilisé les solutions I, II, III et IV. Le tableau 44 montre que l'absorption est proportionnelle au temps pour 0,35 mM et probablement aussi pour 3,4 mM. Par contre, il n'y a pas proportionnalité absorption/concentration externe. L'incorporation est indépendante de la nature du compétiteur.

D. — Étude de levures a déficience respiratoire

L'interprétation des résultats précédents est rendue difficile par la complexité du phénomène étudié. A mesure que l'acide rentre dans la cellule, il est en partie détruit par respiration et en partie incorporé dans les réserves. Il serait préférable que l'on puisse mesurer directement l'entrée avec des cellules incapables de métaboliser l'acide lactique.

L'étude de la perméabilité des cellules à un substrat déterminé est facilitée lorsqu'on peut utiliser des mutants incapables de métaboliser ce substrat (Robichon-Szulmajster, de, 1961). Dans le cas de l'acide lactique, les levures mutantes petites colonies (Ephrussi, Hottinguer et Chimenes, 1949) pourraient jouer ce rôle. Ces souches possèdent les lacticodéshydrogénases (Slonimski 1953), mais elles ont perdu la possibilité de se développer sur un milieu à base d'acide lactique comme seule source de carbone (Galzy, 1959). Elles présentent une déficience respiratoire importante (Tavlitzki, 1949 ; Slonimski, 1949 ; Slonimski, et Ephrussi, 1949). Le déterminisme héréditaire de cette mutation est assez inhabituel (Ephrussi, Hottinguer, et Tavlitzki, 1949 ; Ephrussi, Chen, et Hottinguer, 1950).

Le caractère normal de la respiration est conditionné chez la levure par la présence simultanée d'un facteur héréditaire cytoplasmique et de plusieurs facteurs héréditaires chromosomiques : le facteur cytoplasmique est particulaire et autoreproductible, il est indépendant des gènes mendéliens pour sa reproduction mais en dépend pour son fonctionnement. La mutation « petite colonie » peut être due à la perte du facteur cytoplasmique (petite végétative) ou à la mutation d'un gène (petite

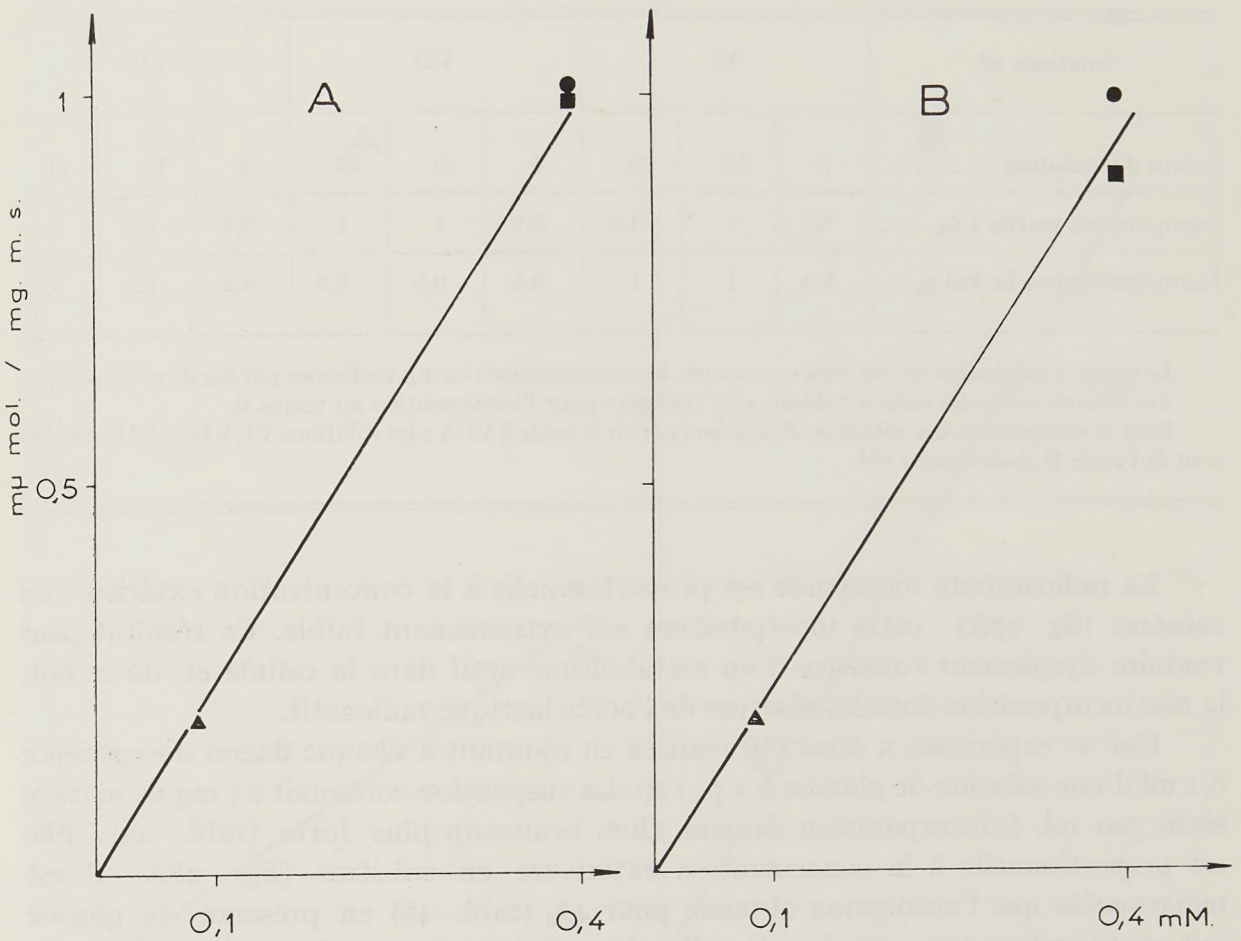


FIG. 27. — *Incorporation de l'acide lactique $2C^{14}$ en fonction de la concentration*
Incubation sans glucose

En abscisse : concentration milli-molaire.
En ordonnée : incorporation en mμ molécules, par mg de matière sèche.
A — Souche $4p_3$.
B — Souche $183p_3$.
Ces souches sont des mutants à déficience respiratoire.
Cercles : solution VI
Carrés : solution VII
Triangles : solution VIII.

ségrégante). La mutation « petite colonie » peut être induite par l'acriflavine : on obtient dans ce cas des mutants du type « petite végétative ». L'influence de divers facteurs sur le taux de mutation de la levure en présence d'acriflavine a été étudiée par MARCOVITCH (1953).

J'ai obtenu à partir des souches 4 et 183 des mutants à déficience respiratoire du type « petite végétative » par traitement à l'acriflavine. Ce sont deux souches appelées $4p_3$ et $183.p_3$

J'ai préparé une suspension de $4p_3$ à 19 mg de matière sèche par ml. En utilisant

les solutions VI, VII et VIII avec les conditions expérimentales habituelles, j'ai trouvé les absorptions indiquées dans le tableau 45.

TABLEAU 45

Incorporation de l'acide lactique par des souches à déficience respiratoire
Incubation en l'absence de glucose

Solutions n°	VI			VII			VIII		
Temps d'incubation.....	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Incorporation souche 4 p_3.....	0,5	1	1,2	0,9	1	1	0,1	0,2	0,3
Incorporation souche 183 p_3...	0,8	1	1	0,4	0,9	0,9	0,2	0,2	0,1

Le temps d'incubation est exprimé en minutes, les incorporations en mμ molécules par mg de matière sèche.
Les valeurs indiquées dans le tableau sont corrigées pour l'incorporation au temps 0.
Pour la composition des solutions d'expérience, voir le texte § VI-A ; les solutions VI, VII et VIII contiennent de l'acide D, L-lactique 2 C^{14}.

La radioactivité incorporée est proportionnelle à la concentration extérieure en substrat (fig. 27A) ; cette incorporation est extrêmement faible. Ce résultat peut traduire simplement l'absence d'un métabolisme actif dans la cellule et, de ce fait, la non incorporation dans les réserves de l'acide lactique radioactif.

Une 2e expérience a donc été réalisée en ajoutant à chaque flacon d'expérience 0,1 ml d'une solution de glucose à 1 p. 100. La suspension contenait 25 mg de matière sèche par ml. L'incorporation devient alors beaucoup plus forte (tabl. 46). Elle est proportionnelle à la concentration extérieure en substrat (fig. 28A). Il est remarquable que l'absorption obtenue pour 4p_3 (tabl. 46) en présence de glucose soit en définitive assez voisine de celle obtenue pour la souche 4 (tabl. 43). On pourrait penser que le rôle du glucose est de fournir de l'énergie à un système d'entrée spécifique de la cellule. Cependant il semble plutôt que le glucose serve simplement d'amorce en déclenchant un métabolisme actif dans la cellule ; l'acide lactique n'est pas métabolisé par les levures à déficience respiratoire lorsqu'il est seul mais pourrait l'être en présence d'un métabolisme actif. Ce point de vue est confirmé par l'étude de l'incorporation de l'acide lactique 1C^{14}. Pour une concentration extérieure de 0,35 mM on obtient en 20 mn une absorption inférieure à 1 m mol. même en présence de glucose ; au contraire, j'ai obtenu une incorporation de 23 m mol dans des conditions identiques avec l'acide lactique 2C^{14}.

Il semble donc probable que l'acide lactique soit décarboxylé par les levures à déficience respiratoire. En résumé, l'acide lactique pénètre peu dans les cellules de levure qui ne présentent pas un métabolisme actif. En présence de glucose, les levures à déficience respiratoire sont capables de métaboliser l'acide lactique qui est décarboxylé. Dans ce cas, l'entrée devient très importante probablement par simple déplacement d'un équilibre de diffusion.

La souche 183p_3 a été étudiée également en effectuant l'incubation en absence

de glucose (tabl. 45 ; fig. 27B) et en présence de glucose (tabl. 46 ; fig. 28B). L'absorption est extrêmement faible dans le premier cas ; en présence de glucose au contraire, l'absorption est importante. Je trouve dans le cas d'une incubation en présence de glucose, une incorporation comparable à celle obtenue avec la souche

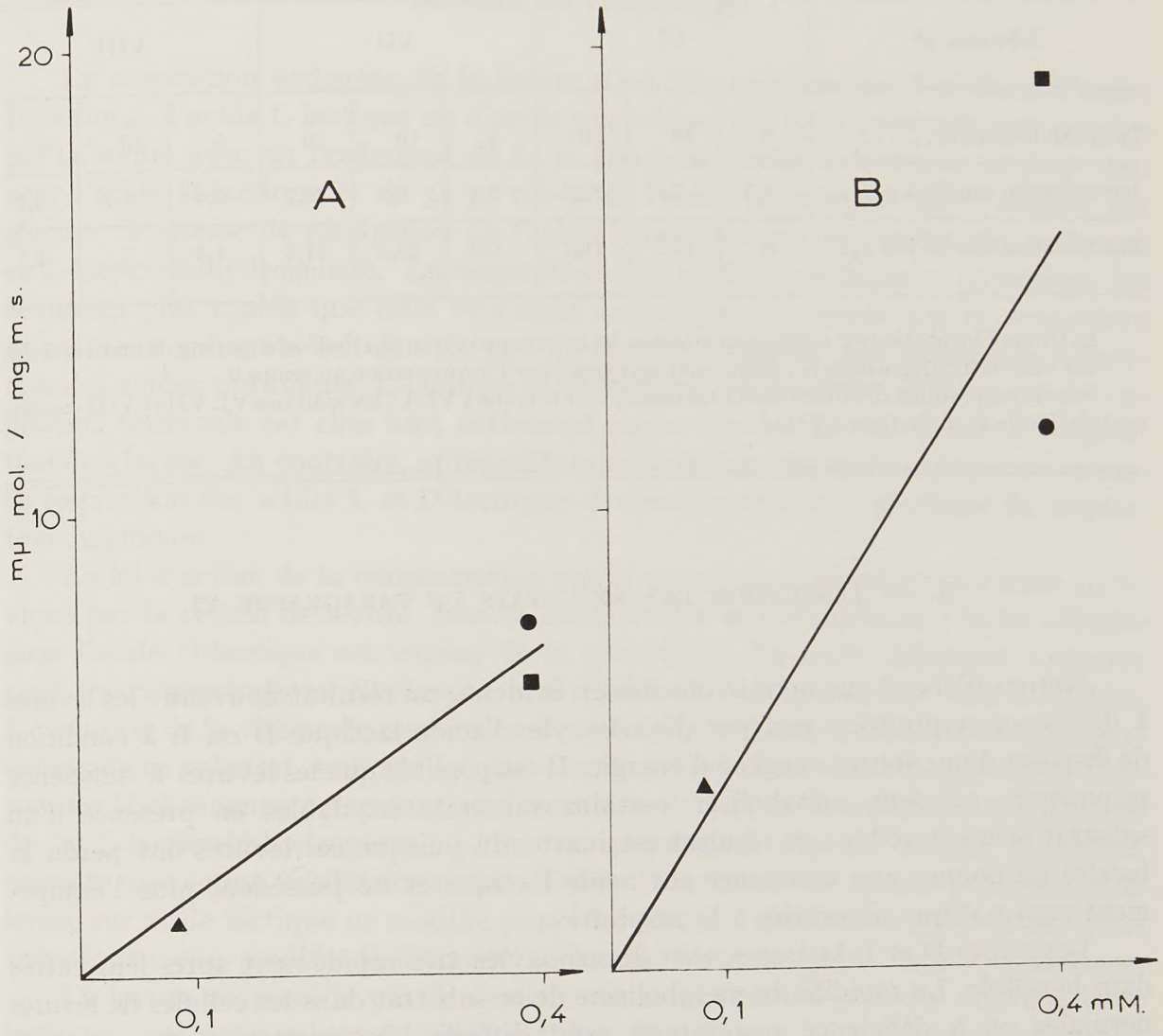


FIG. 28. — *Incorporation de l'acide lactique 2C¹⁴ en fonction de la concentration*
Incubation en présence de glucose

En abscisse : concentration milli-molaire.
En ordonnée : incorporation en mμ molécules, par mg de matière sèche.
A — souche $4p_3$
B — souche $183p_3$.
Ces souches sont des mutants à déficience respiratoire.
Cercles : solution VI.
Carrés : solution VII.
Triangles : solution VIII.

normale n° 183. Nous pouvons remarquer d'autre part que les incorporations sont pratiquement proportionnelles aux concentrations extérieures en substrat aussi bien dans le cas d'une incubation sans glucose (fig. 27B) que dans le cas d'une incubation en présence de glucose.

En définitive, aucune différence ne semble exister entre les souches $4p_3$ et $183p_3$ pour l'incorporation de l'acide lactique.

TABLEAU 46

Incorporation de l'acide lactique par des souches à déficience respiratoire
Incubation en présence de glucose

Solutions n°	VI			VII			VIII		
Temps d'incubation.....	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Incorporation souche 4 p_3.....	1,5	7,6	13,5	2,1	6,3	22,7	0,4	1,2	3,7
Incorporation souche 183 p_3...	6	11,7	16,7	6,3	19,3	41,8	1,3	4	6,5

Le temps d'incubation est exprimé en minutes, les incorporations en mμ molécules par mg de matière sèche.
Les valeurs indiquées dans le tableau sont corrigées pour l'incorporation au temps 0.
Pour la composition des solutions d'expérience, voir le texte § VI-A ; les solutions VI, VII et VIII contiennent de l'acide D, L-lactique 2 C^{14}.

E. — Discussion des résultats du paragraphe VI

Notons d'abord que nous avons mis en évidence un résultat nouveau : les levures à déficience respiratoire peuvent décarboxyler l'acide lactique D ou L à condition de disposer d'une source exogène d'énergie. Il est possible que les levures à déficience respiratoire puissent métaboliser certains substrats oxydables en présence d'un substrat fermentescible ; ce résultat est inattendu puisque ces levures ont perdu la faculté de donner une croissance sur acide lactique et ne possèdent plus l'équipement enzymatique nécessaire à la respiration.

Les acides D et L-lactiques sont décarboxylés très rapidement après leur entrée dans la cellule. La rapidité du métabolisme de ce substrat dans les cellules de levures normales ou à déficience respiratoire rend difficile l'interprétation des résultats obtenus. Il est cependant possible de répondre aux trois questions posées au début de ce paragraphe.

1. — Les mécanismes d'entrée dans la cellule des acides L et D-lactiques sont identiques. A aucun moment, je n'ai pu mettre en évidence de différence entre les deux stéréoisomères.

2. — Les souches sauvages plissées et les souches mutantes colonies lisses se sont comportées de façon identique.

3. — L'incorporation de l'acide lactique varie en fonction de la concentration extérieure. Il est difficile d'estimer la concentration cellulaire interne en acide D,L-lactique. En négligeant l'incorporation dans les réserves avant décarboxylation et la présence dans la cellule d'acide pyruvique formé par déshydrogénation de l'acide lactique il est possible d'admettre que l'incorporation de l'acide lactique 1C^{14} constitue une mesure de la concentration cellulaire interne en acide lactique. Le calcul de la concentration peut être réalisé en admettant que le volume cellulaire interne pour

1 mg de matière sèche, est environ de 2 µl (ROBICHON-SZULMAJSTER, de, 1961). Les valeurs données par ce calcul sont certainement largement surestimées ; elles permettent d'affirmer qu'il n'y a pas, chez la levure, de système de concentration de l'acide lactique.

Résumé du chapitre IV

La respiration endogène de la levure n'est pas modifiée par l'addition d'acide D-lactique, d'acide L-lactique ou d'acide pyruvique. Ces trois substrats sont oxydés par la levure avec un rendement de 84 p. 100 pour l'acide L-lactique, de 80 p. 100 pour l'acide D-lactique et de 34 p. 100 pour l'acide pyruvique. Après culture sur glucose, la vitesse de respiration de l'acide L-lactique semble limitée par la teneur en L-lacticodéshydrogénase. La respiration des acides D-lactique et pyruvique est beaucoup plus rapide que celle de l'acide L-lactique ; il semble que la respiration de ces deux substrats soit limitée par un facteur commun. Les vitesses de respiration des acides pyruvique, L-lactique et D-lactique, ne sont pas limitées par la respiration terminale car elles sont nettement moins rapides que la vitesse de respiration du glucose. Au contraire, après culture de la levure sur acide lactique, la vitesse de respiration des acides L et D-lactiques devient supérieure à la vitesse de respiration du glucose.

La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide pyruvique par la cellule de levure intacte s'est révélée très compliquée ; la loi obtenue pour l'acide D-lactique est voisine de la précédente. La seule différence s'observe pour les concentrations élevées où seul l'acide D-lactique donne une inhibition. L'évolution de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration de ce substrat, suit une loi plus simple ; nous avons observé une courbe d'apparence Michaelienne présentant une constante de Michaelis voisine de la constante de la L-lacticodéshydrogénase. Aux concentrations élevées, l'acide L-lactique présente une action inhibitrice comme l'acide D-lactique. La culture préalable de la levure sur acide lactique ne modifie pas la loi d'action de la concentration de l'acide D-lactique ; elle modifie légèrement la courbe obtenue pour l'acide L-lactique.

La levure ne possède pas de système de concentration pour les acides L et D lactiques ; ces deux substrats pénètrent dans la cellule grâce à un mécanisme identique qui doit être le simple déplacement d'un équilibre de diffusion. Les acides L et D-lactiques sont décarboxylés très rapidement après leur entrée dans la cellule ; l'incorporation dans les réserves s'effectue après décarboxylation. Les levures à déficience respiratoire décarboxylent aussi les acides L et D-lactiques à condition qu'elles puissent disposer d'un substrat métabolisable.

La mutation colonie lisse modifie une seule de ces propriétés de la levure : l' « affinité » pour l'acide L-lactique du système respiratoire de la cellule intacte. La vitesse maximum de respiration de l'acide L-lactique est obtenue pour des concentrations en substrat extrêmement faibles (0,38 mM). Or, j'ai vérifié que cette mutation ne modifie pas l'affinité pour l'acide L-lactique de la lacticodéshydrogénase *in vitro* et ne modifie pas le mécanisme d'entrée dans la cellule de l'acide L-lactique. La mutation colonie lisse contrôle donc le fonctionnement de la L-lacticodéshydrogénase dans la cellule intacte et modifie son affinité pour l'acide L-lactique *in vivo* sans changer sa structure et ses propriétés *in vitro*.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION DES RÉSULTATS

En commençant ce travail, je me suis fixé trois objectifs :

1. — Expliquer les phénomènes d' « accoutumance » observés lorsque la levure est cultivée sur des substrats qui lui sont inhabituels, comme l'acide lactique.

2. — Étudier l'action inhibitrice du glucose sur le métabolisme respiratoire de la levure (Effet-glucose).

3. — Explorer, dans la mesure du possible, le métabolisme de l'acide lactique chez la levure.

J'ai fourni une réponse simple à la première de ces questions. Il se produit, au cours des cultures successives sur acide lactique, une sélection de mutants spontanés caractérisés par une morphologie coloniale particulière et une vitesse de croissance plus rapide dans les cultures sur acide lactique (cf. chapitre II). En outre, des modifications du métabolisme se produisent dès la première culture sur acide lactique ; elles sont liées, soit à la suppression de l'effet glucose, soit à l'induction par l'acide lactique du système enzymatique responsable de son oxydation.

Je vais examiner successivement les résultats obtenus relatifs :

1) au métabolisme de l'acide lactique,

2) à l'effet glucose,

3) à la mutation sélectionnée dans les cultures sur acide lactique ; rappelons que nous avons nommé ces mutants, d'après leur morphologie coloniale sur acide lactique : « colonies lisses ».

Au cours des paragraphes I et II de la discussion j'utiliserai les résultats obtenus avec la souche 59 R « origine » (chapitre I) et avec la souche sauvage n° 4 (chapitre IV); ces deux souches sont plissées. Nous comparerons ensuite au cours du troisième paragraphe les résultats obtenus avec la souche sauvage n° 4 et avec les souches isogéniques colonies lisses n° 183 et 32.

I. — Étude du métabolisme de l'acide lactique

Nous allons étudier d'abord le métabolisme de l'acide lactique chez la levure cultivée sur glucose. La levure respire les deux stéréoisomères L et D de l'acide lactique.

L'étude de l'incorporation d'acide L-lactique $1C^{14}$ radioactif dilué, en utilisant comme compétiteur soit l'acide L-lactique C^{12} soit l'acide D-lactique C^{12}, indique qu'il n'y a vraisemblablement pas de système de concentration de l'acide lactique chez la levure ; les deux stéréoisomères pénètrent dans la cellule par la même voie et peuvent être utilisés indifféremment comme compétiteurs. L'interprétation de ces

expériences est rendue délicate par le fait que le métabolisme respiratoire est très actif et que l'acide lactique est oxydé au fur et à mesure de son entrée dans la cellule. Cependant, il n'existe vraisemblablement pas de système stéréospécifique à l'entrée dans la cellule (cf. chapitre IV, § VI).

Par contre, une spécificité apparaît à l'étape suivante. La déshydrogénation des deux acides lactiques est effectuée par deux déshydrogénases stéréospécifiques liées toutes deux au cytochrome *c*. Mais si la D-lacticodéshydrogénase est rigoureusement inféodée au cytochrome *c*, la L-lacticodéshydrogénase admet d'autres accepteurs *in vitro* (Ferricyanure de potassium). Cependant, aucun autre accepteur que le cytochrome *c* n'est connu dans la cellule pour la L-lacticodéshydrogénase (cf. *loc. cit*).

L'acide pyruvique formé à partir de l'acide lactique semble ensuite prendre une voie identique qu'il provienne de l'acide L-lactique ou de l'acide D-lactique. Le bilan de l'oxydation effectué dans l'appareil de Warburg en présence de quantités limitantes de substrat indique que l'acide L-lactique est oxydé à 84 p. 100 et l'acide D-lactique à 80 p. 100 (cf. chapitre IV § II).

L'étude de l'incorporation de l'acide lactique $1C^{14}$ ou $2C^{14}$ a confirmé ce résultat ; l'acide L-lactique et l'acide D-lactique donnent des pourcentages voisins d'incorporation dans les réserves. J'ai mis en évidence le fait que les deux stéréoisomères sont décarboxylés avant l'incorporation dans les réserves (cf. chapitre IV, § VI). Il paraît probable que les deux acides L et D-lactiques sont décarboxylés par l'oxydase pyruvique qui assure l'entrée du radical CH_3COH — dans le cycle de Krebs. Cette enzyme présente une constante de Michaelis très faible ($1.10^{-4}M$) ; la concentration en acide pyruvique de la cellule étant très faible (cf. chapitre IV, § VI) il paraît probable que la décarboxylation est assurée par cette enzyme. La décarboxylase pyruvique présente une constante de Michaelis beaucoup plus élevée ($1.10^{-3}M$). La concordance des résultats obtenus dans les bilans d'oxydation des acides L et D-lactiques est d'autant plus remarquable que le bilan de l'acide pyruvique est totalement différent.

L'acide pyruvique n'est oxydé qu'à 34 p. 100. Cette valeur doit traduire le fait que l'acide pyruvique, d'origine exogène, est en grande partie incorporé dans les réserves avant décarboxylation. Il n'en est pas de même pour l'acide pyruvique d'origine endogène formé par l'action des lacticodéshydrogénases sur les acides lactiques ; il paraît exclu dans ces conditions que l'acide pyruvique d'origine endogène puisse subir des contrôles métaboliques différents en fonction de son origine.

La comparaison des vitesses de respiration de ces 3 substrats avec celle du glucose peut donner des indications utiles sur la nature des facteurs limitants ces vitesses. Chez la levure ayant proliféré sur glucose, ces facteurs limitants se situent : pour l'acide L-lactique au niveau de la L-lacticodéshydrogénase, pour les acides D-lactique et pyruvique à un niveau qui leur est commun. Le chaînon limitant la vitesse pour ces deux substrats n'est pas connu mais ne peut pas être la respiration terminale (cf. chapitre IV, § II-B).

Les relations, entre la concentration et la vitesse de respiration des acides L-lactique, D-lactique et pyruvique sont plus difficiles à interpréter ; nous allons discuter diverses hypothèses possibles.

1re Hypothèse : *Les courbes représentant l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration correspondent à des réactions enzymatiques définies.*

Ces enzymes pourraient constituer le premier chaînon de la chaine métabolique responsable de l'oxydation du substrat ou, au contraire, le point qui constitue le facteur limitant la vitesse de la réaction.

Dans le cas de l'acide L-lactique, la L-lacticodéshydrogénase est à la fois la 1re enzyme de la chaîne d'oxydation et son facteur limitant : la constante de demi-saturation mesurée *in vivo* est égale à la constante de Michaelis de l'enzyme *in vitro*.

Dans le cas des acides pyruvique et D-lactique, j'ai trouvé deux réactions successives. Il existe bien deux enzymes différentes pouvant décarboxyler l'acide pyruvique mais une seule D-lacticodéshydrogénase est connue chez la levure cultivée en aérobiose. Les vitesses de respiration de ces deux substrats sont généralement assez voisines et j'ai admis qu'un facteur enzymatique commun limitait ces vitesses (cf. chapitre IV, § II-B) ; il serait donc possible que les courbes observées correspondent au facteur limitant commun. Il faudrait admettre alors que la vitesse est limitée au niveau de la décarboxylase et de l'oxydase pyruvique ; nous ne connaissons pas d'autre point de la chaîne métabolique où deux enzymes interviennent. La réaction observée aux faibles concentrations présente une constante de demi-saturation plus élevée dans le cas de l'acide D-lactique (2.10^{-4} M) et dans le cas de l'acide pyruvique (4.10^{-4} M) que la constante de Michaelis de l'oxydase pyruvique (1.10^{-4} M) ; cependant. la différence n'est pas significative dans le cas de l'acide D-lactique. Aux concentrations élevées, les constantes de demi-saturation obtenues avec l'acide D-lactique (28.10^{-4} M) et avec l'acide pyruvique (38.10^{-4} M) sont significativement plus élevées que la constante de Michaelis de la décarboxylase pyruvique. Il est difficile d'admettre que les paramètres (Kd_s et Vm) mesurés lorsque le facteur limitant de la réaction n'est pas la première enzyme de la chaîne correspondent à une réaction enzymatique définie ; la concentration molaire en substrat au niveau de l'enzyme limitante ne peut pas être identique à la concentration molaire initiale de la substance métabolisée par la chaîne enzymatique considérée. De toute façon, les constantes de demi-saturation mesurées ne semblent pas correspondre à des enzymes connues dans le cas des acides pyruvique et D-lactique. Cette première hypothèse doit être rejetée.

2e Hypothèse : *Les courbes représentant l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration s'expliquent par la diffusion intracellulaire de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique.*

La L-lacticodéshydrogénase est située dans une partie de la cellule où l'acide lactique diffuse librement.

La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration des acides pyruvique et D-lactique suit approximativement la courbe donnée par l'équation de la diffusion dans une sphère d'une substance métabolisée à une vitesse constante (cf. chapitre IV, § III). La diffusion intracellulaire serait le facteur responsable de la courbe d'affinité que nous avons obtenue. La respiration des acides pyruvique et D-lactique aurait alors deux facteurs limitants. Un premier facteur de nature enzymatique serait responsable de la vitesse maximum mesurée lorsque la concentration en substrat est saturante (76 mM) ; ce facteur enzymatique limitant serait le même pour l'acide pyruvique et pour l'acide D-lactique (cf. chapitre IV, § II-B). Un deuxième facteur limiterait la vitesse aux concentrations inférieures à la concentration saturante ; ce facteur serait la diffusion intracellulaire. Il faudrait admettre

que les coefficients de diffusion de l'acide D-lactique et de l'acide pyruvique dans la cellule soient très voisins. S'il en était ainsi, on pourrait s'attendre à ce que l'acide L-lactique ait un coefficient de diffusion voisin des précédents et une courbe d'affinité analogue. Il n'en est rien et tout se passe comme si la L-lacticodéshydrogénase se trouvait dans une zone de la cellule où l'acide lactique pénètre librement.

Cette zone pourrait être la portion de la paroi cellulaire où les acides organiques non ionisés pénètrent librement d'après CONWAY et DOWNEY (1949). Cette dernière hypothèse expliquerait peut-être que T. HEYMAN-BLANCHET (1962) n'ait pas trouvé d'activité lacticodéshydrogénasique dans la fraction soluble de broyats de protoplastes. Il paraît plus probable que la L-lacticodéshydrogénase se trouve dans le hyaloplasme de la levure ; une faible partie (20 p. 100 ou souvent moins) se trouve même liée aux particules sédimentables (M. SOMLO, 1962). Dans ces conditions il paraît exclu que la diffusion cellulaire interne constitue le facteur responsable de la courbe d'affinité que nous avons trouvée pour les acides pyruvique et D-lactique.

3e Hypothèse : *Les courbes représentant l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration s'expliquent par la diffusion à l'intérieur des mitochondries de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique. La diffusion des trois acides dans le reste de la cellule s'effectue librement.*

La courbe donnée par l'équation de la diffusion dans une sphère d'une substance métabolisée à une vitesse constante ne dépend que de la concentration saturante en substrat (cf. chapitre IV, § III) ; l'établissement de la courbe théorique correspondante (fig. 22) peut se faire sans qu'aucune hypothèse ne soit formulée sur la nature et les dimensions de la sphère. Rien ne s'oppose à ce que l'hypothèse précédente soit modifiée ; la courbe d'affinité du système respiratoire pour les acides pyruvique et D-lactique ne s'expliquerait pas par la diffusion dans l'ensemble de la cellule mais uniquement par la diffusion dans les mitochondries.

La diffusion des acides L-lactique, D-lactique et pyruvique s'effectuerait pratiquement librement dans le hyaloplasme ; ainsi les lyoenzymes comme la L-lacticodéshydrogénase pourraient présenter *in vivo* la même affinité pour leur substrat qu'*in vitro*. Ainsi s'expliquerait le fait que la constante de demi-saturation du système respiratoire pour l'acide L-lactique soit égale à la constante de Michaelis de l'enzyme *in vitro*. J'ai observé cependant que cette constante de demi-saturation est un peu plus élevée que la constante de Michaelis de l'enzyme chez la levure cultivée sur acide lactique ; cette légère différence pourrait indiquer que la diffusion de l'acide lactique n'est pas totalement libre dans le hyaloplasme. La diffusion pourrait être plus lente dans d'autres parties de la cellule comme les mitochondries ; la diffusion à l'intérieur de la mitochondrie pourrait expliquer la courbe d'affinité que nous avons obtenue expérimentalement pour les acides pyruvique et D-lactique. Il faut se rappeler en effet que l'oxydase pyruvique et la D-lacticodéshydrogénase sont situées dans les mitochondries. Aucun fait expérimental important ne s'oppose à cette manière de voir.

4e Hypothèse : *La diffusion des trois acides dans la cellule s'effectue pratiquement librement. La courbe représentant l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration est identique à la courbe d'affinité de l'enzyme* in vitro *lorsque la vitesse de respiration*

est limitée par la première enzyme de la chaîne. Dans le cas contraire, les courbes sont identiques à celles données par l'équation de la diffusion dans une sphère d'une substance métabolisée à une vitesse constante.

Nous ne possédons que peu de renseignements sur la diffusion des acides organiques dans la cellule. Il est possible que les coefficients de diffusion varient suivant la partie de la cellule considérée (3e hypothèse). On ne peut exclure cependant l'hypothèse que la diffusion des trois acides L-lactique, D-lactique et pyruvique, s'effectue librement dans l'ensemble de la cellule (4e hypothèse). Les courbes d'affinité obtenues pour ces trois substrats pourraient s'expliquer de la façon suivante : la vitesse de respiration de l'acide L-lactique est limitée par le premier maillon de la chaîne d'oxydation ; elle constitue donc une bonne estimation de l'activité lactico-déshydrogénasique. Il est normal que la courbe d'affinité *in vivo* du système respiratoire pour l'acide L-lactique soit identique à celle de l'enzyme *in vitro*, puisque, d'une part nous mesurons l'activité de la L-lacticodéshydrogénase, et que d'autre part la diffusion du substrat est libre. Par contre, dans le cas des acides pyruvique et D-lactique, nous ne connaissons pas le maillon limitant ; nous savons qu'il n'est situé, ni au niveau de la respiration terminale, ni au niveau de la première enzyme de la chaîne.

En mesurant les vitesses de respiration de l'un ou l'autre de ces deux substrats, nous déterminons l'activité de l'enzyme limitante ; mais nous ne pouvons pas connaître la concentration en substrat dont cette enzyme dispose pour fonctionner.

Il n'est pas impossible que la courbe d'affinité d'un système enzymatique complexe pour son substrat suive dans ces conditions une loi analogue à l'équation de diffusion dans une sphère. Mais au lieu d'une diffusion physique on se trouverait en présence d'une « diffusion chimique » à travers un système enzymatique organisé. Le substrat initial se transformant à chaque étape de la chaîne, nous aurions un déplacement permanent de l'équilibre qui rappellerait, du point de vue formel, un équilibre de diffusion. La diffusion dans la cellule entière n'est certainement pas le facteur responsable de la forme des courbes expérimentales obtenues. L'hypothèse d'une diffusion dans les mitochondries ne peut pas être rejetée. Nous pourrions être en présence plus simplement d'un processus de « diffusion chimique » à travers un « système enzymatique organisé ».

Il est difficile de choisir entre la 3e et la 4e hypothèse avec les seuls résultats dont nous disposons. La difficulté provient du fait que les systèmes enzymatiques étudiés ici diffèrent par deux caractéristiques essentielles.

La première enzyme de la chaîne métabolique responsable de l'oxydation de l'acide L-lactique est une lyoenzyme et constitue le facteur limitant la vitesse de la respiration. La première enzyme de la chaîne responsable de l'oxydation de l'acide D-lactique (D-lacticodéshydrogénase) est située au contraire dans les mitochondries et ne constitue pas le facteur limitant de la vitesse de réaction. Il en est de même pour la première enzyme (oxydase pyruvique) de la chaîne d'oxydation de l'acide pyruvique. Les courbes d'affinité de ces systèmes enzymatiques pour leurs substrats peuvent donc différer soit à cause de la localisation cytologique de la première enzyme de la chaîne (3e hypothèse) soit à cause de la localisation du maillon limitant la vitesse de la réaction au début ou au milieu de la chaîne (4e hypothèse). Une vérification de ces hypothèses pourra être réalisée en effectuant l'étude systématique de l'affinité du système respiratoire de la levure *in vivo* pour divers substrats non fermentescibles

(acide acétique, éthanal, éthanol, acide malique etc...). Il serait intéressant d'étudier des systèmes enzymatiques correspondant aux deux types suivants :

— la première enzyme de la chaîne est située dans les mitochondries et constitue le facteur limitant de la réaction ;

— la première enzyme de la chaîne est située dans le hyaloplasme mais ne constitue pas le facteur limitant la vitesse de la réaction.

Il sera possible de vérifier ainsi si les courbes différentes que nous avons obtenues proviennent d'une différence de localisation cytologique des enzymes ou d'une différence dans la place du maillon limitant la vitesse de la réaction.

II. — Étude de l'effet glucose

Nous avons étudié au paragraphe précédent, le métabolisme de l'acide lactique chez la levure préalablement cultivée sur glucose. La culture sur acide lactique provoque des modifications considérables de ce métabolisme (cf. chapitres I et IV) par suite de deux actions conjuguées. D'une part, l'action inhibitrice du glucose (Slonimski, 1955) ne se produit plus ; d'autre part il s'exerce une action inductrice de l'acide lactique. Je vais étudier ici les conséquences de la culture sur acide lactique et discuter les conclusions que l'on peut en tirer soit pour expliquer le mécanisme de l'effet glucose, soit pour compléter nos connaissances sur le métabolisme de l'acide lactique. Ces divers faits ont été discutés dans le cadre des chapitres I et IV ; je ne ferai donc ici qu'un rappel rapide des interprétations formulées en insistant seulement sur quelques points importants.

Notons tout d'abord que le pouvoir respiratoire de la levure cultivée sur acide lactique ne diminue pas pendant la phase de croissance exponentielle (Galzy, et Slonimski, 1957 *a*).. La baisse du pouvoir respiratoire dans les cultures sur glucose provient donc bien de l'action inhibitrice du glucose. Nous avons montré que cette action ne s'exerce pas seulement sur la respiration terminale (Galzy, et Slonimski, 1957 *b*.). En effet, les activités de plusieurs enzymes appartenant au cycle de Krebs (fumarase, succino-déshydrogénase), de l'alcool-déshydrogénase et des lacticodéshydrogénases sont plus élevées dans les cultures sur acide lactique que dans les cultures sur glucose. De plus, j'ai constaté que l'activité de ces enzymes, dans les cultures sur glucose, augmentait en fin de croissance, quand le glucose est épuisé et que le développement se poursuit sur l'alcool accumulé. Il apparaît donc que l'absence de l'inhibiteur glucose est le facteur essentiel des modifications constatées dans le métabolisme de la levure cultivée sur acide lactique. Plus récemment, Haboucha (1962) a cultivé des levures sur acide acétique et sur éthanol comme seul substrat carboné ; dans ces conditions, le pouvoir respiratoire de la levure est nettement supérieur à celui de la levure cultivée sur glucose. Ces résultats confirment donc les miens.

Cependant, l'action inhibitrice du glucose n'est pas seule en cause. La levure cultivée sur acide lactique respire généralement les acides L et D-lactiques beaucoup plus rapidement que le glucose.

Les résultats exposés permettent de penser que l'acide L-lactique induit la biosynthèse de la L-lacticodéshydrogénase en présence et en absence de croissance. De même,

HABOUCHA (1962) a constaté que la levure cultivée sur éthanol ou sur acide acétique respire ces deux substrats plus rapidement que le glucose.

VANDERWINKEL (1959) a montré par ailleurs que la culture sur acide acétique induit la biosynthèse du shunt glyoxylique et de certaines enzymes intervenant dans l'oxydation de l'acide acétique. Il paraît donc probable que la présence d'un substrat oxydable entraîne l'activation de la biosynthèse des enzymes responsables de son oxydation.

Sans vouloir insister sur ces divers faits qui ont été longuement discutés au cours du chapitre IV, notons que ces résultats sont conformes à la théorie de « l'adaptation des systèmes multi-enzymatiques », émise par SLONIMSKI (1953).

Les enzymes respiratoires constituent une chaîne de transfert ; dans ce cas, la notion de substrat n'est pas aussi simple que pour des réactions d'hydrolyse. Selon SLONIMSKI, dans cette chaîne multi-enzymatique, la biosynthèse d'une enzyme pourrait être induite par la présence simultanée du donateur et de l'accepteur, qui assurent le transfert. Nous venons de voir qu'il en est ainsi puisque la culture sur acide lactique active la biosynthèse aussi bien des lacticodéshydrogénases que des enzymes de la respiration terminale.

La biosynthèse des enzymes respiratoires pourrait être induite à la fois par l'oxygène et par les divers substrats. Les résultats précédemment cités de HABOUCHA et de VANDERWINKEL permettent de penser qu'une augmentation de la synthèse de tout ou partie du système respiratoire pourrait être obtenue de la même façon par culture de la levure au contact des substrats des diverses enzymes impliquées dans l'adaptation respiratoire.

La loi d'action de la concentration sur la vitesse de la respiration de l'acide D lactique n'est pas modifiée par la culture préalable de la levure sur acide lactique. Nous venons de voir pourtant que le système respiratoire de la levure est profondément modifié par la culture en absence de glucose. Ces modifications d'activité des enzymes du système respiratoire n'ont donc eu aucune influence sur le facteur limitant la vitesse de la respiration de l'acide D-lactique aux concentrations inférieures à la concentration saturante 76 mM. Cette observation pourrait constituer un argument en faveur de la troisième hypothèse émise au paragraphe précédent ; il est normal que la loi d'action de la concentration sur la vitesse ne soit pas modifiée par la culture sur acide lactique si le facteur limitant la vitesse est la diffusion de l'acide lactique dans la mitochondrie. La culture sur acide lactique modifie la constitution enzymatique de la cellule mais ne doit pas changer des propriétés physiques comme les coefficients de diffusion d'un substrat.

La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide L lactique par la souche sauvage est légèrement différente suivant que la levure est cultivée sur acide lactique ou sur glucose. Pour la levure cultivée sur acide lactique nous voyons que la constante de demi-saturation n'est plus égale à la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase *in vitro*. Ce résultat traduit peut être simplement le fait que la diffusion de l'acide lactique n'est pas totalement libre dans la cellule.

M. SOMLO (1962) a montré que la L-lacticodéshydrogénase peut se trouver dans les broyats de levure sous deux formes : une forme soluble dans le surnageant et une forme liée aux mitochondries. Certaines souches ne possèdent les deux formes de L-lacticodéshydrogénase qu'après culture sur acide lactique ; l'enzyme liée aux

mitochondries leur manque après culture sur glucose. La présence ou l'absence de l'enzyme liée aux mitochondries pourrait apporter des modifications dans l'affinité des souches pour l'acide L-lactique.

III. — Étude de la mutation colonie lisse

L'étude génétique de 18 mutants a montré que ces mutations colonies lisses sont monofactorielles. Sept loci pouvant donner cette mutation ont été mis en évidence ; ils ne sont pas liés entre eux. La présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés lui assure le phénotype colonie lisse ; les gènes mutés sont récessifs devant leurs allèles sauvages. Trois de ces loci (pl_2, pl_4 et pl_8) sont liés au centromére ; ils se trouvent sur des chromosomes différents puisqu'ils ne sont pas liés entre eux. Un calcul simple a permis de montrer que le nombre de loci susceptibles de donner la mutation « colonie lisse » était au moins égal à 10.

Notons d'abord que ce chiffre est comparable au nombre de loci qui contrôlent la chaîne de synthèse de l'adénine chez la levure (Roman, 1956) ou de l'arginine chez le coprin (Prévost, 1962). Il serait donc permis de penser à priori que les loci mis en évidence contrôlent chacun la synthèse d'une enzyme appartenant à une chaîne métabolique. La mutation d'un de ces loci entraînerait la perte d'une enzyme et, de ce fait, la rupture de la chaîne. Ce schéma expliquerait également le caractère récessif de l'allèle muté. Cependant, il est difficile de concevoir que la rupture de la chaîne de synthèse d'un métabolite soit responsable des modifications physiologiques observées chez les mutants « colonie lisse ».

Une situation analogue se trouve dans le cas des gènes polymères : Halvorson et ses collaborateurs (1963) ont montré en effet que six loci au moins interviennent pour contrôler la biosynthèse de l'α glucosidase. Chez une levure qui ne fermente pas le maltose, la mutation d'un quelconque de ces six gènes peut restaurer le pouvoir de fermenter ce substrat. Il semble que l'on se trouve dans ce cas en présence de gènes de structure ; les enzymes obtenues présentent des propriétés rigoureusement identiques quel que soit le gène responsable de leur biosynthèse. Le même gène de structure pourrait donc se trouver en 6 loci différents et non liés. Les gènes mutés responsables de la biosynthèse de l'α glucosidase sont dominants sur leurs allèles sauvages respectifs. L'étude du dosage des gènes montre que l'action des divers gènes mutés peut être additive ; en particulier, la souche homozygote pour l'allèle muté à un locus déterminé contient davantage d'enzyme que la souche hétérozygote. Une différence fondamentale est tout de suite visible entre la situation décrite par Halvorson pour les gènes polymères MA et celle des gènes *pl* ; les allèles mutés sont dominants dans la série des gènes polymères MA et récessifs dans le cas des gènes *pl*.

***

Le mode d'action des gènes *pl* a été étudié. Chez une souche haploïde plissée, la mutation provoque une modification de la morphologie coloniale ainsi qu'une vitesse de croissance plus rapide dans les cultures sur acide lactique (cf chapitre II). L'action des sept gènes est apparemment identique.

Une souche sauvage et deux souches mutantes homozygotes ont été comparées du point de vue physiologique ; ces trois souches étaient isogéniques sauf pour les deux couples de gènes étudiés. La mutation colonie lisse n'a modifié ni le bilan d'oxydation ni la vitesse de respiration des acides pyruvique, L-lactique et D-lactique (cf. chapitre IV, § II). L' « affinité » du système respiratoire *in vivo* pour les acides pyruvique, D-lactique et L-lactique, a été également étudiée ; la mutation colonie lisse modifie l' « affinité » du système respiratoire pour l'acide L-lactique (cf. chapitre IV, § III). La vitesse maximum de respiration de l'acide L-lactique par la cellule intacte préalablement cultivée sur glucose, est obtenue pour une concentration en substrat (0,38 mM) nettement inférieure à la constante de Michaelis de la L-lacticodéshydrogénase. L'augmentation de l' « affinité » du système respiratoire de la cellule intacte pour l'acide L-lactique pouvait s'expliquer par l'un de ces deux schémas classiques : modification de la structure de la L-lacticodéshydrogénase entraînant une affinité plus grande pour son substrat ; présence d'un système de concentration stéréospécifique assurant au niveau de l'enzyme une concentration en substrat supérieure à la concentration exogène. Or, la mutation n'a pas modifié l'affinité de cette enzyme pour son substrat *in vitro* (cf. chapitre IV, § V). L'entrée dans les cellules de l'acide lactique C^{14} a donc été mesurée. L'interprétation de ces expériences est rendue délicate par la rapidité du métabolisme de l'acide lactique chez les levures normales. J'ai eu recours pour cette raison à l'emploi de mutants à déficience respiratoire. Le mécanisme d'entrée dans la cellule des acides L et D-lactiques semble inchangé chez les souches mutantes ; il est permis de penser que les acides L et D-lactiques pénètrent par simple diffusion dans la cellule aussi bien chez les souches mutantes que chez les souches sauvages (cf. chapitre IV, § VI). En définitive, la présence d'un système de concentration stéréospécifique pour l'acide lactique n'a pas pu être mise en évidence. Les caractéristiques physiologiques des mutants colonies lisses ne peuvent donc s'expliquer par l'acquisition d'un système de concentration analogue aux perméases décrites par Cohen et Monod (1957).

Chez la souche sauvage, la vitesse de respiration de l'acide L-lactique par la cellule intacte constitue une bonne mesure de l'activité de la L-lacticodéshydrogénase. Il apparaît donc nettement que la mutation colonie lisse modifie les conditions de fonctionnement de la L-lacticodéshydrogénase dans la cellule. Les gènes *pl* assurent apparemment la régulation du fonctionnement d'une enzyme ; ils n'interviennent ni sur sa structure ni sur sa biosynthèse.

***

L'effet du dosage des gènes a été étudié au niveau physiologique. Une souche homozygote pour les deux gènes mutés pl_1 et pl_5 présente les mêmes caractéristiques qu'une souche ne portant que pl_1 ou pl_5 (cf. chapitre IV, § III). Les mutations des divers loci n'ont donc pas une action cumulative puisqu'il n'y a pas d'additivité chez les doubles mutants.

L'analyse statistique des résultats expérimentaux semble indiquer que le phénotype des hétérozygotes est intermédiaire au point de vue de l' « affinité » du système respiratoire *in vivo* pour l'acide lactique. Rappelons que le gène muté *pl* est récessif devant son allèle sauvage PL pour la morphologie coloniale.

La mutation des deux loci pl_1 et pl_5 a abouti à des modifications rigoureusement identiques. Bien que les autres loci mis en évidence n'aient pas fait l'objet d'une étude aussi approfondie, il est permis de penser que les modifications de métabolisme qu'ils provoquent sont les mêmes quel que soit le gène de la série qui ait muté.

***

La mutation colonie lisse entraîne une modification de la morphologie coloniale et une augmentation de la vitesse de croissance sur les milieux où le substrat carboné est l'acide lactique ; ces modifications constituent probablement l'effet tertiaire du gène. L'effet secondaire du gène consiste en une amélioration de l' « affinité » du système respiratoire de la cellule intacte pour l'acide L-lactique. L'effet primaire du gène reste inconnu ; certains éléments permettent cependant d'en discuter le mécanisme.

Les différences entre souches mutantes et sauvages sont visibles chez la levure cultivée sur glucose. Elles subsistent après culture sur acide lactique malgré les modifications importantes intervenues dans le métabolisme. La différence entre souches mutantes et sauvages n'est donc pas la présence d'un système enzymatique adaptatif induit par l'acide lactique.

La mutation colonie lisse pourrait provoquer une perte de fonction puisque le gène muté est récessif.

Les gènes de la série *pl* contrôlent le fonctionnement d'une enzyme dans la cellule. Ils sont différents des gènes régulateurs du type classique qui contrôlent la biosynthèse des enzymes (Jacob, et Monod, 1961 ; Sager, et Ryan, 1961) de tels gènes ne modifiant pas le rythme de synthèse de l'enzyme mais son fonctionnement, occupent une place particulière dans la vie de la cellule. La mise en évidence de ce type de régulation est assez aléatoire. Nous y sommes parvenus grâce à un faisceau de circonstances exceptionnellement favorables. La L-lacticodéshydrogénase de la levure est à la fois le premier maillon de la chaîne métabolique et son facteur limitant ; son substrat semble pénétrer librement dans la zone de la cellule où elle se trouve. Pour ces raisons, la vitesse de respiration de l'acide L-lactique constitue une bonne mesure de l'activité de la L-lacticodéshydrogénase. Il est rare que l'activité d'une enzyme puisse être ainsi mesurée dans la cellule intacte. Nous avions donc un matériel particulièrement favorable pour la mise en évidence d'éventuels mécanismes régulateurs. Nous ne connaissons pas l'effet primaire de ces gènes ni les mécanismes modifiant l'affinité de l'enzyme pour son substrat. M. Somlo a montré que les propriétés de la L-lacticodéshydrogénase dans les broyats différaient suivant que l'enzyme se trouvait dans le surnageant, ou au contraire liée aux mitochondries ; l'affinité pour l'acide L-lactique pourrait être modifiée pour des raisons analogues (mode de fixation sur des structures cytologiques par exemple). L'étude des mutations *pl* pose le problème du contrôle génétique des mécanismes régulateurs de la cellule. Les gènes de ce type pourraient contrôler la localisation des enzymes, leur liaison avec les structures cytologiques, leur intégration dans les chaînes métaboliques. Ils pourraient jouer un rôle essentiel dans les processus de différenciation cellulaire.

RÉSUMÉ

J'ai exposé dans l'introduction les raisons qui ont justifié la mise en œuvre de ce travail.

Je m'étais fixé les buts suivants :

— Recherche des mécanismes génétiques et enzymatiques de « l'accoutumance » de la levure à la croissance sur acide lactique.

— Détermination des voies métaboliques utilisées pour l'oxydation de l'acide lactique.

— Étude du mécanisme de l'effet glucose.

L'ensemble des résultats obtenus m'a permis d'apporter une contribution à la connaissance du métabolisme de l'acide lactique, et du contrôle génétique de ce métabolisme. A l'issue de ce travail, un certain nombre de conclusions se sont dégagées.

1) *Mise en évidence d'un phénomène d'« accoutumance »*

J'ai noté une augmentation lente de la vitesse de croissance de certaines levures au cours des cultures successives sur acide lactique.

2) *Mise en évidence d'une mutation*

Des mutants caractérisés par la morphologie coloniale (colonies lisses) sur les milieux gélosés à base d'acide lactique, et par une vitesse de croissance plus élevée sur les milieux liquides où l'acide lactique constitue la seule source de carbone sont sélectionnés au cours de cette accoutumance.

Cette mutation est héréditairement stable en multiplication végétative. Sa sélection explique l'élévation progressive de la vitesse de croissance au cours des cultures successives de la levure sur acide lactique.

3) *Étude génétique de la mutation colonie lisse*

J'ai étudié 18 mutants d'origine indépendante. Ces divers mutants ont été croisés avec une souche sauvage et la descendance de ces croisements a été étudiée en analysant les tétrades. Des tests fonctionnels d'allélisme ont été réalisés systématiquement ; la descendance des diploïdes obtenus a été également étudiée par analyse des tétrades.

J'ai mis ainsi en évidence 7 loci ; plusieurs mutations d'origine indépendante ont été obtenues pour chacun d'eux. La présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés dans l'un quelconque des loci lui assure le phénotype lisse. Les allèles mutants sont récessifs. Les sept loci ne sont pas liés entre eux. Les loci pl_2, pl_4 et pl_8 sont liés au centromère ; ils se trouvent donc sur des chromosomes différents puisqu'ils ne sont pas liés entre eux.

4) *Étude du métabolisme de l'acide lactique chez la levure cultivée sur glucose*

J'ai montré que la levure peut métaboliser par la voie respiratoire les acides L et D-lactiques ; j'ai comparé le métabolisme de ces deux stéréoisomères.

L'addition d'acides pyruvique, L-lactique ou D-lactique, ne modifie pas la respiration endogène. Le bilan de l'oxydation indique que ces 3 substrats sont oxydés respectivement à 34 p. 100, 84 p. 100 et 80 p. 100. J'ai montré que l'acide pyruvique se comporte différemment selon son origine exogène ou endogène, c'est-à-dire selon qu'il constitue le substrat exogène ou qu'il provient de la transformation dans la cellule de l'acide lactique.

La vitesse de respiration de l'acide L-lactique est limitée par la teneur en L-lacticodéshydrogénase. Les vitesses de respiration des acides D-lactique et pyruvique sont égales entre elles et supérieures à la précédente ; elles doivent être limitées par un facteur commun qui ne peut pas être la respiration terminale.

La levure ne posséde pas de système stéréospécifique de concentration pour les acides L et D-lactiques ; l'acide lactique pénètre dans la cellule par simple diffusion. L'acide lactique (L ou D) est décarboxylé très rapidement dans la cellule ; l'incorporation dans les réserves s'effectue presque exclusivement après la décarboxylation. Il est intéressant de noter que les levures à déficience respiratoire, qui ne se multiplient pas sur ce substrat et ont perdu la possibilité de respirer, décarboxylent les acides L et D-lactiques lorsqu'elles disposent d'un substrat métabolisable comme le glucose.

La relation entre la concentration et la vitesse de respiration des acides pyruvique et D-lactique, est complexe ; elle suit une courbe correspondant à l'équation de la diffusion dans une sphère d'une substance métabolisée à vitesse constante. J'ai discuté plusieurs hypothèses ; la plus probable paraît être que le facteur limitant la vitesse de ces deux substrats aux concentrations inférieures à 76 mM est la diffusion dans les mitochondries. Au contraire, pour l'acide L-lactique, cette même loi donne une courbe très voisine de celle que pourrait donner la L-lacticodéshydrogénase *in vitro ;* ce dernier résultat n'est valable que pour les souches sauvages. Aux concentrations supérieures à 76 mM, j'ai observé une inhibition du système respiratoire par les acides L et D-lactiques.

5) *Étude de l'effet glucose*

J'ai mis en évidence la fait que l'action inhibitrice du glucose est très vaste ; elle porte, non seulement sur la respiration terminale mais également sur la biosynthèse des enzymes du cycle de Krebs (succino-déshydrogénase, fumarase), des lactico-déshydrogénases et de l'alcool déshydrogénase. J'ai discuté la part qui revient dans ces modifications à l'action inhibitrice du glucose et à l'action inductrice du substrat de croissance (acide lactique) utilisé dans nos expériences.

J'ai constaté que le pouvoir fermentaire de la levure cultivée sur acide lactique est fortement diminué.

6) *Étude du métabolisme de l'acide lactique chez la levure cultivée sur acide lactique*

L'acide L-lactique induit une biosynthèse plus active de la L-lacticodéshydrogénase. La levure cultivée sur acide lactique respire les acides L et D-lactiques plus rapidement que le glucose ; j'avais observé l'inverse pour la levure cultivée sur glucose.

L'« affinité » du système respiratoire pour les acides pyruvique et D-lactique n'est pas modifiée par la culture sur acide lactique. Par contre, l'« affinité » pour l'acide L-lactique suit une loi légèrement différente pour la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose.

7) *Étude du mode d'action de la mutation « colonie lisse »*

La mutation colonie lisse a été étudiée pour les loci pl_1 et pl_5. Elle ne modifie pas le bilan de l'oxydation et la vitesse de respiration des quatre substrats étudiés (acide pyruvique, acide D-lactique, acide L-lactique et glucose). L'« affinité » du système respiratoire pour les acides pyruvique et D-lactique demeure également inchangée. La mutation colonie lisse augmente l'« affinité » du système respiratoire de la cellule intacte pour l'acide L-lactique. Pourtant, elle ne modifie ni l'affinité de la L-lactico-déshydrogénase mesurée *in vitro*, ni le mécanisme d'entrée des acides D et L-lactiques dans la cellule.

Les 2 loci étudiés donnent le même résultat ; il est probable qu'il en est de même pour tous les autres. Il est permis de penser, dans ces conditions, que je n'ai saisi ici que l'effet secondaire du gène. Une discussion a été présentée sur l'effet primaire de ces gènes.

8) *Conclusion sur le mode d'action des gènes de la série* pl

Les gènes de la série *pl* régularisent le fonctionnement d'une enzyme dans la cellule. Ils constituent un nouveau type de gènes régulateurs ; ils n'ont pas d'action sur la biosynthèse de l'enzyme, mais modifient ses conditions de fonctionnement.

SUMMARY

A STUDY OF THE GENETICS AND PHYSIOLOGY OF THE METABOLISM OF LACTIC ACID BY « SACCHAROMYCES CEREVISIAE » HANSEN

Yeast grown on a synthetic medium based on lactic acid as the sole source of carbon sometimes showed a progressive increase of growth rate in long term cultures. A selection of mutants characterized by a colonial morphology (smooth colony) was observed and which explained these variations in growth rate.

A study of the smooth colony mutants revealed 7 independent loci : the presence in a haploid strain of any one of the mutant *pl* genes would give rise to the smooth phenotype. These mutant genes were recessive. Three of the loci were linked with the centromere.

The metabolism of L- and D-lactic and pyruvic acids was examined in yeast cultured on glucose or lactic acid. The following properties of the mutant strains were compared with those of a wild isogenic strain : oxidation balance and the incorporation of the three substrates into reserves; the speed of respiration and the effect of substrate concentration on that speed; the mechanism of entry into the cell ; characteristics of certain enzymes. The mechanisms of the glucose effect was discussed.

In the smooth mutation colony there was an increased affinity of the respiratory system of the intact cell for L-lactic acid, but there was no modification either of the affinity of L-lactic dehydrogenase measured *in vitro*, or of the mechanism of the entry of D- and L-lactic acids into the cell. The 2 loci studied gave similar results. The primary effect of these genes was considered.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALVAREZ A., VANDERWINKEL E., WIAME J. N., 1958. L'oxydation de l'acide pyruvique chez la levure. *Bioch. Biophys. Acta.*, **28**, 333.

APPLEBY C. A., MORTON R. K., 1954. Crystalline cytochrome b_2 and lactic deshydrogenase of yeast. *Nature*, **173**, 749.

APPLEBY C.A., MORTON R. K., 1960. Lactic deshydrogenase and cytochrome b_2 of Baker's yeast. The amino acid composition of the crystalline enzyme. *Biochem. J.*, **75**, 72.

APPLEBY C. A., MORTON R. K., 1960. Lactic deshydrogenase and cytochrome b_2 of Baker's yeast The deoxyribose polynucleotide component and the physicochemical properties of the crystalline enzyme. *Biochem. J.*, **75**. 258

BOERI E., CUTOLO E., LUZZATI M., TOSI L., 1955. Preparation and properties of cytochrome b_2 from yeast. *Biochem. and Biophys.*, **56**, 2, 487.

BOERI E., CREMONA T., SINGER T. P., 1960. The Dα hydroxy acid deshydrogenase of yeast. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **2**, 298.

CLAVILIER L., 1962. Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des réversions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse*, Paris.

COHEN G. N., MONOD J., 1957. Bacterial Permeases. *Bacteriol. Rev.* **21**, 3, 169-194.

COHN M., COHEN G. N., MONOD J., 1953. L'effet inhibiteur spécifique de la méthionine dans la formation de la méthionine synthase chez *Escherichia coli*. *C. R. Ac. Sci.*, **236**, 746.

CONWAY E. J., DOWNEY H., 1949. An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem. J.*, **47**, 347-355.

COOK A. H., 1958. *Chemistry of biology of yeast.* Academic Press. New York.

DUCET G., PENELOUX A., 1962. Influence de la diffusion de l'oxygène sur la respiration des tissus végétaux. *C. R. Ac. Sci.*, 1640.

EBISUZAKI K., GUZMAN BARRON E. S. G., 1957. Yeast alcool deshydrogenase II. *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 555-564.

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H., CHIMENES A. M., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation petite colonie. *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 351.

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H., TAVLITZKI J., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. II. Étude génétique du mutant « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 419.

EPHRUSSI B., CHEN S., HOTTINGUER H., 1950. Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B. II de la levure de boulangerie. *Heredity*, **4**, 337.

EPHRUSSI B., 1953. *Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms.* Oxford, Clarendon Press.

EPHRUSSI B., SLONIMSKI P. P., TAVLITZKI J., YOTSUYANAGI Y., 1956. Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aérobie. *C. R. Lab. Carlsberg*, Sér. Physiol., **26**, 6-87

FROMAGEOT Cl, DESNUELLE P., 1935. Dosage des acides α cétoniques. *Biochem.*, **279**, 174.

FURTH O., LIEBEN F., 1922. Über Milschsäurezestörung dursh hefe und durch Blutzellen. *Biochem. Z.*, **128** 144.

GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1957-*a*. Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Ac. Sci.*, **245**, 2423.

GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1957-*b*. Évolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *C. R. Ac. Sci.*, **245**, 2556.

GALZY P., 1958. Observations sur l'utilisation d'un électrophotomètre pour l'étude de la croissance des levures. *Ann. Techn. agric.*, **4**, 453-464.

GALZY P., 1959. Étude des possiblités d'utilisation en technologie d'une levure à déficience respiratoire. (mutant « petite colonie »). *Ann. Technol. agric.*, **3**, 321-324.

GALZY P., 1960. Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Ac. Sci.*, **250**, 3719-3721.

GALZY P., 1962. Sur le contrôle génètique de la mutation « colonie lisse » chez *Saccharomyces cerevisiae* *C. R. Ac. Sci.*, **254**, 2842-2844.

GERARD R. W., 1931. Oxygen diffusion into cells. *Biol. Bull.*, **60**, 245.

HABOUCHA J., 1962. Étude de la respiration chez les levures hautes et basses. *Rev. Ferment. Ind. Alim.*, **17**, 4, 99-106, **5**, 143-157.

HALVORSON H. D., WINDERMAN S., GORMAN J., 1963. Comparison of the α glucosidases of *Saccharomyces* produced in response to five non allelic maltose genes. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 1. 42.

HAWTHORNE D. C., 1955. The use of linear asci for chromosomes mapping in *Saccharomyces*. *Genetics*, **40**, 4.

HAWTHORNE D. C., MORTIMER R. K., 1960. Chromosomes mapping in *Saccharomyces* : Centromère — linked genes. 1-2. *Genetics*, 1085-1110.

HIRSCH H. M., 1952. A comparative study of aconitase fumarase and DPN linked isocitric deshydrogenase in normal and respiration deficient yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 674.

HOLZER H., SCHULTZ G., VILLAR C., PALASI, JÜNTGEN-SELL J., 1956. Isolierung der hefecarboxylase und untersuchungen über die Aktivität des enzymes in lebenden Zellen. *Biochem. Z.*, 327-331.

HOLZER H., GOEDDE H. W., 1957. Zwei wege von pyruvat zu acetylcoenzym a him hefe. *Biochem. Z.*, **329**, 175-191.

HOLZER H., 1961. Regulation of carbohydrate metabolism by enzyme competition. *Cold Spring Harbor Symp. quantitative Biology*, **26**, 277-288.

HORECKER B. L., SMYRNIOTIS P. Z., 1955. 6 phosphogluconic deshydrogenase in COLOWICK S. P. et KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*, **1**, 323, Academic Press, New York.

INGRAM M., 1955. *An introduction to the biology of yeast.* Pitman & Sons, LTD, London.

JACOB F., MONOD J., 1961. On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. quantitative Biology*, **26**, 193.

JOHNSTON J. R., MORTIMER R. K., 1959. Use of Snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.*, **78**, 2, 292.

KATTERMAN R., SLONIMSKI P. P., 1960. Effet différentiel des analogues structuraux d'aminoacides sur la formation des enzymes respiratoires induites par l'oxygène. *C. R. Ac. Sci.*, **250**, 220-221.

KILKENNY B. C., HINSHELWOOD C., 1951. The utilisation of carbon sources by certain yeast strains. *Proc. Roy. Soc. London, B.*, **375**, 138.

KORNBERG A., 1955-*a*. Isocitric deshydrogenase of yeast (DPN) in COLOWICK S. P. and KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*, **1**, 705.

KORNBERG A., 1955-*b*. Isocitric deshydrogenase of yeast (DPN) in COLOWICK S. P., and KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*, **1**., 707.

KORNBERG A., HORECKER B. L., 1955. Glucose 6 phosphate deshydrogenase in COLOWICK .S P. and KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*, **1**., 323. Academic Press New-York.

Mme LABEYRIE F., SLONIMSKI P. P., NASLIN L., 1959. Sur la différence de stérospécificité entre la déshydrogenase lactique extraite de la levure anaérobie et celle extraite de la levure aérobie. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 262.

LEMOIGNE M., AUBERT J. P., MILLET J., 1955. La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. *Rev. Ferment. et Ind. Alim.*, **10**, 1, 17.

LINDEGREN C. C., LINDEGREN G., 1943. A new method for hybridizing yeast. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **29**, 306.

LINDEGREN C. C., 1949. The yeast cell : its genetics and cytology. Educational Publish inc., Saint-Louis

LUZZATI M., CLAVILIER L., SLONIMSKI P. P., 1959. Inhibition par l'histidine de la réversion prototrophe chez la levure diploïde hétéroallélique pour le locus adénine-histidine. *C. R. Ac. Sci.*, **249**, 1412.

LYNEN F., 1943. Zum biologischen abfan der essigsaüre, II die wirkung von maonisaüre auf den aban der essigsaüre durch hefe. *Ann. Chem.*, B D, **554**, 40.

MARCOVICH H., 1953. Influence du pH sur l'action toxique et mutagène de l'acriflavine sur les levures. *Ann. Inst. Past.*, **85**, 443.

MATHER K., 1949. *Statistical analysis in Biology.* Methuen & C.o LTD, London.

MEYERHOF, 1925. Über den Einflusz des Sauerstoffs und die alkoholische Gärung der hefe. *Biochem. Z.*, **162**,43.

MEYERHOF. LOHMAN, 1926. Über atmung und kohlehydratumsatz tierischer Gewebe III über den unterschied von dan I milchsaüre für Atmuny un Kohlehydrade synthese im organisms. *Biochem. Z.*, 171-421.

MORTON R. K., 1959-*a*. Lactic deshydrogenase and cytochrome b_2 of Baker's yeast. Purification and crystallization. *Biochem. J.*, **71**, 492.

MORTON R. K., 1959-*b*. Lactic deshydrogenase and cytrochrome b_2 of Baker's yeast. Enzymic and chemical properties of the crystalline enzyme. *Biochem. J.*, **73**, 539.

NYGAARD A. P., 1958-1959. Lactic deshydrogenase of yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 450 ; **33**, 517 **35**, 212.

NYGAARD A. P., 1960-*a*. The formation of D and L Lactic cytochrome *c* reductase during respiratory adaptation in « *Saccharomyces cerevisiae* ». *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 317.

NYGAARD A. P., 1960-*b*. A series of lactic deshydrogenases in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 178.

NYGAARD A. P., 1961-*a*. D (—) lactic cytochrome *c* reductase, a flavoprotein from yeast. *J. Biol. Chem.*, **236**, 3, 920.

NYGAARD A. P., 1961-*b*. Induction of D (—) and L (+) lactic cytochrome *c* reductase in yeast. *J. Biol. Chem.*, **236**, 5, 1585.

NYGAARD A. P., 1961-*c*. Kinetic properties of yeast D (—) lactic cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **236**, 7, 2128.

NYGAARD A. P., 1963. *The enzyme.* Academic Press New York.

PENELOUX A., DUCET G., 1963. Influence de la tension d'oxygène sur la respiration. *Bull. Soc. Franc. de Physiol. Végét.* **9**, 1, 16.

POMPER S., BURKHOLDER P., R. 1949. Studies on the biochemical genetics of yeast. *Proc. Nat. Ac. Sci.* **35**, 456.

POMPER S., 1951. Recent developments in yeast genetics. *Wallerstein Laboratories*, **44**, 31.

PRÉVOST G., 1962. Étude génétique d'un basidiomycète : *Coprinus Radiatus* F. R. ex Bolt. Thèse. Paris. *Ann. Sci. Nat., Bot.*, 1963.

RACKER E., 1955. Alcool deshydrogenase from backer's yeast in COLOWICK S. P. and KAPLAN N. O. *Methods* in *Enzymology*, **1.**, 500, Acad. Press, New York.

RASHEVSKY N., 1960. *Mathematical biophysics. Physico-mathematical foundations of Biology*. Dover publications, inc., New York N. Y., **1.**

ROBICHON-SZULMAJSTER H. de, 1956. Le méso-inositol, facteur de croissance pour *Saccharomyces cerevisiæ*. I. Intervention et spécificité du méso-inositol dans le métabolisme des pyrimidines. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 313.

ROBICHON-SZULMAJSTER H. de, 1961. Contribution à l'étude génétique et physiologique du métabolisme du galactose chez la levure. *Ann. Technol. Agric.*, **10**, 81-142.

ROMAN H., JACOB F., 1959. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 1032.

SAGER R., RYAN F. J., 1961. *Cell heredity*. An analysis of the mechanisms of heredity at the cellular level John Wiley & Sons, Inc., New-York, London.

SHIN-YI CHEN M., 1950. Sur une nouvelle technique de croisement des levures. *C.R. Ac. Sci.*, **230**, 1897-1899

SINGER T. P., KEARNY E. B., GROGOLIN C., BOERI E., FORD E. B., 1960. On the multiplicity of lactic deshydrogenases in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **3**, 4., 428.

SLONIMSKI P. P., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 510.

SLONIMSKI P. P., EPHRUSSI B., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants petites colonies. *Ann. Inst. Pasteur*, **77**, 47.

SLONIMSKI P. P., 1953. *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*. Masson, Paris.

SLONIMSKI P. P., 1955. Adaptation respiratoire : développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. In : *Proc. third internat. Congr. Biochem.*, Brussels. — Academic Press Inc., New York.

SLONIMSKI P. P., TYSAROWSKI W., 1958. Sur l'existence de deux déshydrogénases lactiques chez la levure et sur la conversion au sein de la cellule, de l'une en l'autre. *C. R. Ac. Sci.*, **246**, 1111-1114.

SLONIMSKI P. P., 1959. Respiration and the growth of yeast. *Soc. Chem. Industr. Monogr.* n° 3.

SOMLO M., 1962. La L-lacticodéshydrogénase de la levure aérobie. Comparaison des propriétés de l'enzyme liée et de l'enzyme soluble. *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 333-346.

STRICKLAND L. H., 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 698.

TAVLITZKI J., 1949. Étude de la croissance des mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 497.

TORE LEVRING, 1945. Some experiments on the conversion of acetic and lactic acid with Baker's yeast. *Arkiv. för Botanik*, 32 A 3.

UMBREIT W. W., BURRIS R. H., STAUFFER J. F., 1949. Manometric techniques and tissus metabolism.,

VANDERWINKEL E., 1959. Contribution à l'étude du mécanisme oxydatif chez la levure au niveau subcellulaire. *Rev. Ferment. Ind. Alim.*, **14**, 4, 131, **6**, 251.

VANDERWINKEL E., 1960. Le métabolisme oxydatif chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse, Université libre de Bruxelles.*

VAN NIEL, COHEN, 1942. In INGRAM M. 1955. An introduction to the Biology of yeast. *Pitman et Sons. LTD London,*

VESSEREAU A., 1948. Méthodes statistiques en Biologie et en Agronomie. *Libr. Baillère J. B et Fils, Paris.*

WIAME J. M., 1956. Le rôle biosynthétique du cycle des acides tricarboxyliques. *Rev. Ferm. Indus. Alim.*, **11**, 4, 193.

WINGE O., 1935. On haplophase and diplophase in some *Saccharomyces*. *C. R. Lab. Carlsberg, Série Physiol.* **21**, 77.

WINZLER R. J., 1940. The oxydation and assimilation of acetate by baker's yeast. J. *Cellular Comp. Physiol.*, **15**, 343.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 13 1964 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Ann. Technol. agric., 1962, **13** (3), 263-282.

RECHERCHES SUR LA DÉTECTION DES ANTHOCYANNES DIGLUCOSIDES DANS LES VINS ET LES JUS DE RAISIN (PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ET FLUORISCOPIE DES TACHES OBTENUES)

L. DEIBNER et M. BOURZEIX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

La recherche des anthocyannes diglucosides présentes dans les vins et les jus de raisin rouges constitue un problème analytique encore incomplètement résolu tant au point de vue de la finesse de la séparation qu'au point de vue de la sûreté de détection des quantités minimes de ces substances.

Le présent travail a pour but non seulement d'améliorer les techniques existantes, mais également de proposer de nouveaux modes opératoires comprenant l'utilisation de différents dispolitifs originaux et de diverses manipulations destinés à faciliter l'élaboration des chromatogrammes, leur développement et l'examen fluoriscopique, plus précis, des taches des anthocyannes diglucosides séparées par la chromatographie ascendante unidimensionnelle et bidimensionnelle telles quelles ou après leur extraction au moyen d'acétate de plomb.

I. — INTRODUCTION

Comme nous l'avons indiqué dans notre mise au point concernant la détection des anthocyannes diglucosides dans les vins et les jus de raisin (DEIBNER, BOURZEIX, 1964), depuis le mois de juillet 1959 des études systématiques ont été entreprises à la Station de Narbonne dans le but de perfectionner le mode opératoire, basé sur l'emploi de la chromatographie ascendante simplifiée et la fluoriscopie des taches obtenues, et de préciser en même temps les avantages et les inconvénients d'autres techniques.

Ces longues recherches trouvaient leur justification dans l'intérêt pratique et scientifique de la détection des anthocyannes. Si au point de vue pratique les tolérances admises sont acceptables et sont acceptées pour le moment, ce n'est pas

le cas au point de vue scientifique. Tout d'abord il n'y a aucune raison logique de limiter le perfectionnement d'une méthode analytique dans le but de simplifier ou dans celui de faire coïncider la réduction volontaire de sa sensibilité avec le postulat concernant l'absence rigoureuse des diglucosides dans les cépages de *Vitis vinifera*. Or, les diglucosides peuvent se trouver dans ceux-ci en petite quantité : d'ailleurs même les vins hybrides sont susceptibles de contenir naturellement très peu de ces composés. De ce fait, la détection de ces corps s'avère plus difficile et devient tributaire de manipulations plus délicates, de précautions plus rigoureuses et de détails analytiques plus nombreux, d'où la nécessité de leurs études minutieuses pour établir un mode opératoire adapté aux particularités du problème posé.

Nos recherches ont tenu compte de ces servitudes. Les nombreux résultats obtenus dans chaque domaine particulier seront exposés successivement dans ce qui suit.

II. — EXPOSÉ DES RÉSULTATS DES RECHERCHES EFFECTUÉES

A. — ÉTUDE DE LA CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE SIMPLIFIÉE SUR PAPIER

L'étude détaillée de tous les facteurs intervenant pendant la réalisation et l'interprétation des chromatogrammes suivra exactement les grandes divisions du mode opératoire habituel, à savoir :

— l'élaboration des chromatogrammes ;
— leur développement ;
— leurs séchage et conservation ;
— l'examen fluoroscopique des chromatogrammes ;
— l'efficacité du procédé fluoroscopique.

1. — Élaboration des chromatogrammes

L'élaboration convenable des chromatogrammes est tributaire de plusieurs facteurs tels que la pose et le séchage des taches de départ, les caractéristiques des micropipettes et des papiers, les dimensions des chromatogrammes, les grandeurs des taches de départ, les doses optimales de vin.

1) *Pose et séchage des taches de départ*

La mise au point des « orgues chromatographiques » a résolu d'une manière rationnelle le problème de la pose facile et du séchage rapide et simultané de plusieurs taches de départ sur les chromatogrammes de dimensions variables (Deibner, Bourzeix, 1960 *b* ; 1963 *a*).

2) *Choix des micropipettes*

Le même mémoire mentionné plus haut (1960) relate les essais comparatifs effectués avec les micropipettes de différentes origines.

Actuellement, nous utilisons les micropipettes des Éts Pleuger (83U020 N° B) de 2 microlitres (mm^3), à remplissage automatique.

3) *Essais de différents papiers chromatographiques*

Bate-Smith (1948 *a*, *b*), Bate-Smith et Westall (1950), promoteurs des études chromatographiques des colorants d'origine végétale, ainsi que Harborne (1958 *a*) ont fait appel au papier Whatman n° 1.

Les premières recherches sur les colorants du raisin et de ses dérivés ont eu recours également aux papiers Whatman n° 1 et 4 (Sastry 1951, Sastry, Tischer 1952), mais, d'une façon générale, l'utilisation du papier Whatman n° 1 est la plus répandue soit en Amérique, soit au Portugal (Fernandès 1958) ou en Suisse (Rentschler, Tanner, 1959, 1960).

Par contre, en France, depuis les travaux de P. Ribéreau-Gayon (1953, 1954), le papier Arches 302 est d'un emploi persque exclusif, tandis qu'en Allemagne le papier Schleicher und Schüll 2043 bmgl constitue son équivalent.

Tout d'abord, il est nécessaire que le fond du papier examiné à la lumière de Wood soit exempt de teintes comparables à celle de la fluorescence à déceler. D'autre part, il y a lieu de contrôler l'efficacité de son pouvoir de séparation des taches et des fluorescences sans que l'intensité de la fluorescence rose soit affaiblie ou supprimée.

Nos essais ont porté sur trois papiers d'origines différentes : Arches 302, Schleicher-Schüll n° 2043 bmgl et Whatman n° 4.

Examiné en lumière de Wood, le papier allemand est bleuté, tandis que le papier Arches 302 est violacé, très légèrement rosé ; la teinte prise par le papier Whatman n° 4 est intermédiaire entre les deux précédentes.

Après avoir fait subir à ces trois sortes de papier le traitement par le tampon de Britton-Robinson dans les conditions habituelles du développement des chromatogrammes et après leur séchage les mêmes teintes apparaissent, mais plus atténuées.

La comparaison de trois qualités de papier a été également faite par chromatographie des vins de quatre cépages : l'*Alicante-Bouschet*, et trois hybrides *Couderc 7120*, *Seibel 7053*, *Seyve-Villard 18315*, le solvant de développement étant le tampon de Britton-Robinson.

Les papiers Arches 302 et Schleicher-Schüll ont donné les résultats identiques au point de vue de la durée d'ascension (105 mn pour 22 cm à 19°C) et des fluorescences, qui ont la même position et la même importance.

Le papier Whatman 4 diffère en ce qui concerne la vitesse d'ascension (45 mn pour 22 cm) ; en outre, les taches et les fluorescences sont beaucoup moins bien séparées et moins nettes. En plus la fluorescence rose du vin hybride de *Couderc 7120* n'apparaît pas.

Les résultats obtenus permettaient de conclure à l'équivalence du papier Arches 302 et du papier Schleicher-Schüll n° 2043 acheté en France.

D'après les constatations effectuées par ailleurs, ce dernier papier diffèrerait de celui vendu en Allemagne.

On attribue au papier Arches 302 l'avantage de ne pas posséder une direction privilégiée. En principe, cette particularité réduit au minimum les déchets survenant au cours du découpage.

Les vérifications effectuées nous permettent d'affirmer que le papier Arches 302 possède également une direction privilégiée tout au moins pour les lots utilisés pour nos essais.

C'est ainsi que pour les deux lots portant le n° IA65, achetés aux dates éloignées de plusieurs mois, le sens le plus rapide correspond à la plus petite dimension (54 cm), le format commercial des feuilles étant de 56 × 54 cm ; en chromatographie descendante bidimensionnelle pour les feuilles carrées de 32 cm de côté on observe les différences de durée de développement de 2 h à 2 h 40 mn pour les solvants aqueux et organiques préconisés par P. Ribéreau-Gayon (1953, 1954, 1959 *a*, *b*), obtenus par le mélange de *n*-butanol-acide acétique-eau en porportion V/V — 4 : 1 : 5.

Le sens le plus rapide étant le sens de la largeur (54 cm pour la feuille commerciale) nous l'avons adopté comme sens du premier développement dans tous les essais.

4) *Caractéristiques des chromatogrammes*

α. *Dimensions des chromatogrammes.*

Le papier est utilisé en feuilles de différentes dimensions en fonction des dimensions des en ceintes chromatographiques, soit 18 × 18, 20 × 20, 50 × 16, 17 × 16 ou 22 × 16 cm.

β — *Emplacement, forme et grandeur des taches de départ.*

La ligne de départ est tracée au crayon à 2 cm du bord inférieur pour les chromatogrammes courants et à 5 cm dans le cas des chromatogrammes longs. La distance de 5 cm, généralement con-

seillée (BOULANGER, BIZERTE, 1959), assure, comme nous l'avons constaté, la montée plus régulière du solvant à partir de la ligne de départ et permet d'obtenir des contours plus nets des taches après le développement.

Un autre trait est tiré à 1 cm du bord supérieur du papier. Sur la ligne de départ et à partir de 2 cm du bord vertical du chromatogramme on dispose les bandes de départ.

Les essais effectués ont démontré que la longueur des bandes doit être de 2 cm. La longueur de 1,5 cm produit, après développement, des taches fluorescentes d'une surface trop petite et d'une netteté insuffisante. Par contre, la longueur de 2,5 cm donne naissance aux taches fluorescentes trop larges. En ce qui concerne la largeur des bandes elle ne doit pas dépasser 2,5 mm, ce qui est facile à obtenir au moyen des « orgues chromatographiques ». En général, la largeur préconisée pour les bandes est de l'ordre de 3-4 mm (BOULANGER, BIZERTE, 1959, p. 191).

L'espacement entre ces bandes de départ présente une grande importance en raison de l'élargissement des taches au cours du développement ; l'intervalle de 3 cm donne une séparation convenable entre les taches de 2 chromatogrammes voisins, tandis qu'un intervalle de 2 cm est tout juste acceptable pour les chromatogrammes à faible longueur de développement, de l'ordre de 21 cm. Notons que l'espacement optimal est compris entre 3 et 4 cm (BOULANGER, BIZERTE, 1959, p. 191).

γ — *Doses optimales de liquide à chromatographier.*

Comme nous l'avons démontré plus loin, il est possible de déceler 1 p. 100 d'hybride dans un vin de coupage à partir de 50 microlitres, cette quantité pouvant être augmentée jusqu'à 70 microlitres à la suite d'un premier résultat douteux.

2. — DÉVELOPPEMENT DES CHROMATOGRAMMES

1) *Appareillage*

Nous avons expérimenté un certain nombre d'enceintes chromatographiques munies de leurs supports pour les chromatogrammes et des récipients à solvant mobile.

La cuve pour multiples chromatographies sur papier Shandon n° 2150 permet de développer simultanément plusieurs chromatogrammes carrés ascendants à deux dimensions dans des conditions strictement identiques. Les chromatogrammes mesurent au maximum 20 cm ce qui parfois constitue un inconvénient. L'utilisation des cloches à microscope (dimensions intérieures : diamètre 24 cm, hauteur 43 cm), ou à vide ou de la combinaison cloche-cylindre permet non seulement d'agrandir les dimensions des chromatogrammes, mais également de recourir aux supports à double potence, dont la hauteur peut être fixée à volonté à l'aide d'un système de réglage (fig. 1).

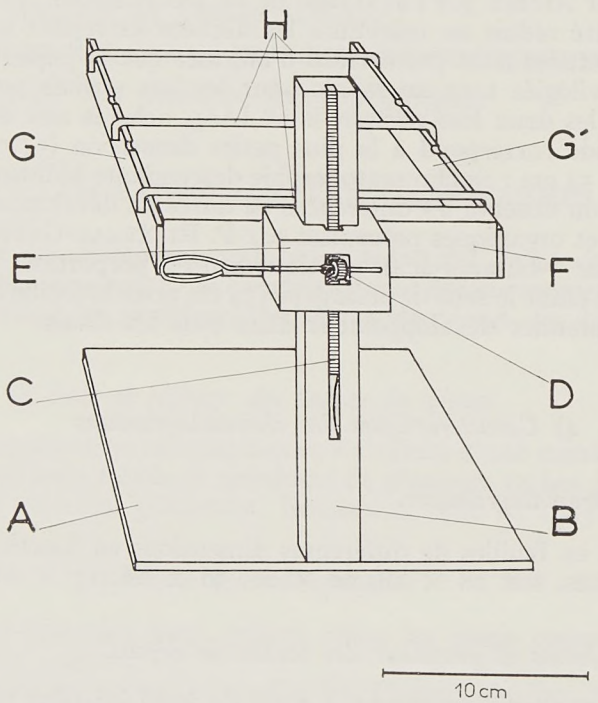


FIG. 1. — *Suppor à double potence mobile pour les chromatogrammes*

Un tel support réglable peut être fait en matière plastique ou en bois paraffiné. La crémaillière doit être en acier inoxydable. Les chromatogrammes sont suspendus aux baguettes de verre.

Un tel support présente plusieurs avantages :

— la possibilité de choisir la longueur du chromatogramme ;

— l'immersion des chromatogrammes se fait au même moment et à la même profondeur dans le récipient à solvant ;

— l'arrêt du développement, comme son début, se fait simultanément pour toutes les feuilles chromatographiques ;

— l'égouttage des chromatogrammes après développement est aisé, par élévation de la double potence [1].

Les dimensions du support peuvent varier suivant les grandeurs des enceintes chromatographiques.

La combinaison cloche-cylindre est composée d'un cylindre (hauteur 29,5 cm, diamètre intérieur 28,5 cm) et d'une cloche à vide (hauteur totale 38 cm, diamètre intérieur 28,5 cm), du support à potence réglable et du récipient à solvant mobile, le tout posé sur une plaque de verre. Une telle enceinte, dont la hauteur intérieure est de 54 cm, est susceptible d'abriter 4 chromatogrammes de 16 cm de largeur et de 50 cm de longueur au maximum ; cette dernière peut être diminuée par l'abaissement de la potence et par l'élévation du récipient à solvant.

En outre cette enceinte, permettant l'accès facile aux chromatogrammes, peut être utilisée pour la chromatographie descendante.

Malheureusement, les cylindres en verre ordinaire du type utilisé sont difficiles à trouver actuellement. Or, leur prix de revient est très inférieur à celui des enceintes parallélipédiques livrées dans le commerce.

2) *Solvants*

La plupart de nos essais ont été faits avec le tampon de Britton et Robinson de pH 1,81 en raison de son emploi préférentiel répandu car il fournit des bons résultats comparativement à la solution d'acide citrique à 6 g par litre donnant des taches et les fluorescences moins nettes.

La composition de ce tampon est la suivante :

Acide phosphorique	3,92 g
Acide acétique	2,40 g
Acide borique cristallisé	2,48 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

Parallèlement on a cherché à sélectionner un solvant d'une composition plus simple, possédant un pouvoir ascensionnel et réparateur plus accentués, renforçant la fluorescence rose du malvoside et doué d'un effet conservateur vis-à-vis de cette fluorescence et de la coloration des substances séparées sur les chromatogrammes.

Plusieurs solvants ont été expérimentés et, en particulier, la solution approximativement décinormale d'acide phosphorique de pH 1,7 (8,82 g H_3PO_4 par litre), le tampon de Veibel de pH 2,04 (0,01 N HCl + 0,09 N KCl) obtenu par le mélange de 100 ml d'acide chlorhydrique décinormal et de 900 ml de solution décinormale de chlorure de potassium (Huybrichts, 1947), la solution centinormale d'acide trichloracétique de pH 2,1.

Les nombreux essais effectués ont démontré que le tampon de Veibel assure une meilleure séparation par rapport au tampon Britton et Robinson et à la solution d'acide phosphorique de pH 1,7. Par contre, ce dernier rend plus nettes les fluorescences roses.

Comparé au tampon de Britton et Robinson, la solution centinormale d'acide trichloracétique permet d'obtenir les mêmes intensités de fluorescence rose des taches diglucosidiques qui apparaissent plus détachées, plus étalées en raison de son pouvoir ascensionnel, plus grand, à savoir, pour 22 cm — 1 h 38 (A. T.) et 1 h 52 (B. R.) et pour 41,4 cm — 6 h 30 (A. T.) et 8 h 30 (B. R.).

Il ressort de ces données que l'emploi de l'acide trichloracétique présente un grand intérêt pour les longs chromatogrammes car dans ce cas la vitesse de l'ascension dépasse de 25 p. 100 telle du tampon Britton et Robinson.

Par contre, la conservation des chromatogrammes au point de vue des fluorescences et de la couleur des taches des substances rouges séparées est bien supérieure dans les cas du tampon de Britton et Robinson et de la solution d'acide phosphorique par rapport au tampon de Veibel et à la solution d'acide trichloracétique. En effet, les chromatogrammes obtenus à l'aide de ces derniers solvants accusent au bout d'un mois un bleuissement des taches des anthocyannes et la diminution et même la disparition des fluorescences roses.

[1] La mise au point *d* et la construction du support à potence réglable ont été effectuées par M. Mary, à l'atelier de la Station.

Nous avons également expérimenté le mélange butanol normal (1 vol.) acide chlorhydrique 2 N (1 vol.), utilisé pour la première fois par BATE-SMITH et WESTALL (1950) et appliqué aux vins par BIEBER (1960).

En ce qui concerne la vitesse d'ascension de ce solvant sur papier Arches 302, nous avons constaté qu'elle est variable, peut être en fonction de la profondeur d'immersion difficile à rendre uniforme pour tous les chromatogrammes utilisés dans les mêmes conditions. C'est ainsi que pour la durée d'ascension de 7 h 15 on a observé pour quatre chromatogrammes les distances parcourues de 21, 19,5, 18,5, 17,5 cm.

Si les fluorescences roses observées chez la plupart des vins hybrides, comme *Seyve-Villard 18315* apparaissent plus ramassées et plus nettes que celles obtenues avec le tampon de BRITTON et ROBINSON ; par contre, le butanol chlorhydrique détermine pour les vins de *Vitis vinifera*, comme l'*Aramon* ou le *Terret* noir, l'apparition de fluorescences roses à l'emplacement des taches des monoglucosides ce qui entraîne la confusion dans le cas des coupages des vins *Vitis vinifera* et hybrides.

Les essais d'utilisation de la phase organique du mélange butanol normal (4 vol.) — acide acétique (1 vol.) — eau (5 vol.) n'ont pas donné des résultats intéressants en raison du manque de pouvoir séparateur. Ce mélange ne permet pas de déceler 1 p. 100 de vin hybride *Seyve-Villard 18315*, même pour les substances colorées concentrées au moyen de l'acétate de plomb basique.

Afin de mieux séparer et concentrer les diglucosides, nous avons fait appel à la technique de l'humidification du papier préalablement au développement préconisé par STARON (1961).

Les essais ont montré que, si effectivement l'humidification permet d'obtenir la meilleure concentration et la séparation des taches, ses effets sont variables en raison des difficultés du séchage d'où l'insuffisance dans la reproductibilité des résultats. Par ailleurs, la durée de développement devient très longue. Il faut environ 24 heures pour obtenir une ascension du solvant BRITTON et ROBINSON d'une douzaine de centimètres. De plus, la fluorescence rose apparaît à l'emplacement des taches monoglucosides. Par contre, la conservation de taches des anthocyanes sur le chromatogramme est bien meilleure.

3. — Séchage des chromatogrammes

En raison de l'influence défavorable de la chaleur ainsi que de la lumière sur les anthocyannes du jus de raisin et du vin, il est nécessaire de sécher les chromatogrammes le plus rapidement possible à leur sortie de l'enceinte chromatographique, sans les exposer trop à l'action de la lumière.

Le séchage des chromatogrammes doit être exécuté à froid, à une température ne dépassant pas 30°C.

A cet effet, on peut utiliser des ventilateurs d'appartement, ou même un séchoir à cheveux. Nous utilisons une étuve à dessication des chromatogrammes, type Société Paris-Labo, modèle n° 3121 spécial comportant 4 ventilateurs supplémentaires disposés sur la partie inférieure. Cette amélioration constitue la conséquence de nos multiples essais destinés à obtenir la température uniforme à tous les niveaux de l'étuve, à 2-4° près. Les chromatogrammes sont d'abord égouttés pendant quelques minutes au-dessus du récipient à solvant.

Les chromatogrammes humides sont suspendus aux baguettes de verre à la partie supérieure de l'étuve à l'aide de pinces triangulaires en acier inoxydable.

On porte la température de l'étuve à + 30°C, on fait circuler l'air en ventilation directe, en mettant également en marche quatre ventilateurs installés sur le fond de l'étuve.

La durée du séchage est courte, de l'ordre de 15 mn.

L'état de siccité convenable des chromatogrammes est nécessaire à la réussite de leur examen en lumière ultra violette.

4. — Examen des chromatogrammes en lumière ultraviolette

L'efficacité de l'examen des chromatogrammes en lumière ultraviolette dépend de plusieurs acteurs ; leur importance respective sera précisée dans ce qui suit.

1) *Choix de la source de rayonnement, son agencement*

D'une façon générale, la lumière de Wood constitue une source de rayonnement ultraviolet la plus souvent employée. Ce rayonnement est produit par les lampes à vapeur de mercure à haute pression, munies d'écrans ou d'ampoules en verre spécial à l'oxyde de nickel, appelé verre de Wood. Ce dernier laisse passer les radiations ultraviolettes intenses au voisinage de la longueur d'onde 3 650 Å — 3 655 Å (90,9 p. 100).

Le rayonnement 3 650-3 655 Å est utilisé en France et en Allemagne. En Suisse, RENTSCHLER et TANNER (1959-1960) font appel à la radiation de 2 540 Å. BIOL et MICHEL (1961) utilisent également la radiation de 2 537 Å, produite par les lampes Mineralight livrées par les Établissements Vilber-Loumat à Paris. La lumière produite par ces dernières paraît plus sélective, mais leur puissance, égale à un watt, est faible par rapport à celle des lampes de marque Mazda ou Phillips qui est de l'ordre de 120-125 watts.

Il existe des écrans filtrants à la longueur d'onde de 2 850 Å, très fragiles et d'un prix élevé.

Nous avons expérimenté les lampes munies d'ampoules en verre de Wood de 125 watts (type Mazda et Phillips).

Il existe deux façons de les employer : en diascopie et en épiscopie.

α — *Dispositifs en diascopie.*

Les dispositifs fonctionnant en diascopie permettent d'examiner le chromatogramme par transparence. Nous avons effectué quelques essais en diascopie en utilisant le dispositif mis au point à la Station (DEIBNER, 1951) pour observer le virage des indicateurs fluorescents. L'examen du chromatogramme n'est pas commode en raison de l'impossibilité de le voir en entier ; en outre, il est également impossible de comparer simultanément plusieurs chromatogrammes. Le réchauffement du chromatogramme constitue un facteur perturbateur au point de vue des fluorescences.

β — *Dispositifs en épiscopie.*

L'utilisation des dispositifs fonctionnant en épiscopie, c'est-à-dire en lumière réfléchie, permet d'éviter l'échauffement des chromatogrammes.

L'examen des chromatogrammes peut s'effectuer suivant les modes opératoires plus ou moins perfectionnés, mais toujours en chambre noire.

Dispositif simplifié.

Le mode opératoire le plus simple se contente d'un écran noir et d'une lampe de Wood, munis d'un réflecteur.

L'examen comparatif de plusieurs chromatogrammes de toutes dimensions est aisé dans ces conditions. Toutefois, l'observateur, placé en arrière de la lampe, est mal protégé et sa vue se trouve assez vite fatiguée par la réflexion abondante des rayons ultraviolets.

Tunnel fluoriscopique.

Ce dispositif se présente sous forme d'une caisse en bois léger ou en contre-plaqué peint en noir à l'intérieur (une couche de peinture noire mate de première qualité suffit). Il peut être fixe, disposé sur une paillasse, par exemple, ou mobile, installé sur une table roulante (voir les figures 2 et 2-*a*).

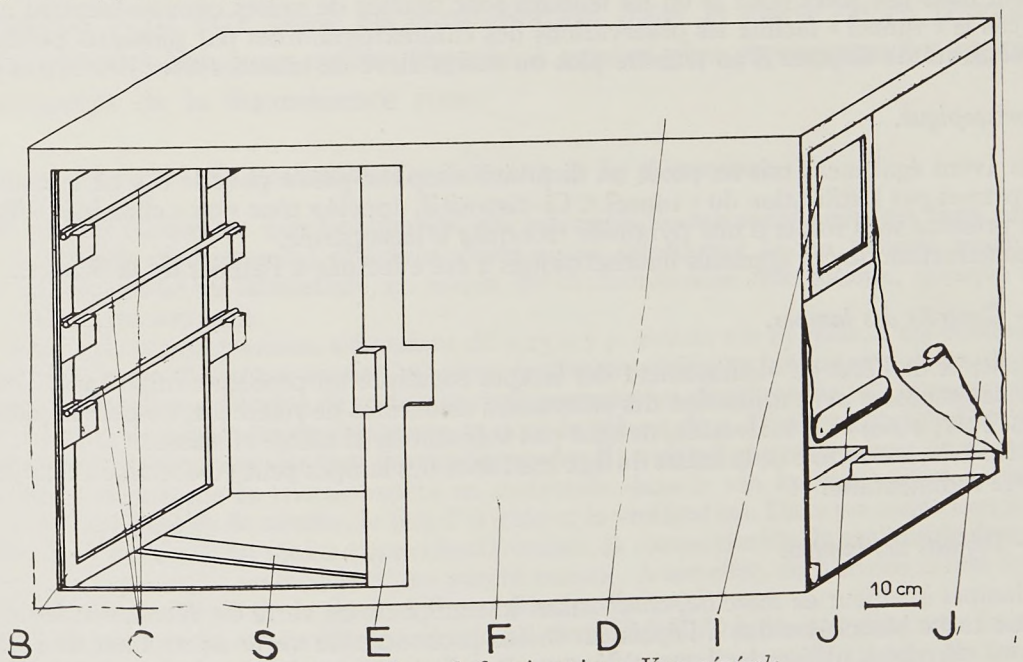


FIG. 2. — *Tunnel fluoriscopique. Vue générale*

Les dimensions sont les suivantes : longueur 135 cm, largeur 69 cm, hauteur 80 cm. La porte coulissante E, les rideaux mobiles en tissu noir J et J', la fenêtre mobile I (28,5 × 34,5 cm), munie d'un verre jaune (Sté Sovirel n° 4), absorbant les rayons ultraviolets, permettent d'isoler la lampe de Wood et le ou les chromatogrammes et en même temps de préserver l'observateur contre les rayons ultraviolets réfléchis.

Les chromatogrammes, suspendus aux baguettes de verre C de l'écran mobile B, peuvent être examinés sous différents angles grâce au levier S fixé en bas de l'écran et commandé par une tige placée sur le plancher du tunnel et débouchant sous la fenêtre I à gauche de l'opérateur.

La distance entre la lampe de Wood R et l'écran B peut varier entre 50 et 100 cm par déplacement sur les glissières du support G sur lequel sont installées la lampe R et ses dépendances ainsi qu'une lampe électrique O à support flexible M.

Les déplacements, vertical et horizontal, du projecteur abritant la lampe de Wood, disposé à droite de l'observateur, sont aisés.

Le toit du tunnel peut comporter juste au-dessus de la lampe quelques trous d'aération pour activer l'élimination de la chaleur produite pendant le fonctionnement de la lampe.

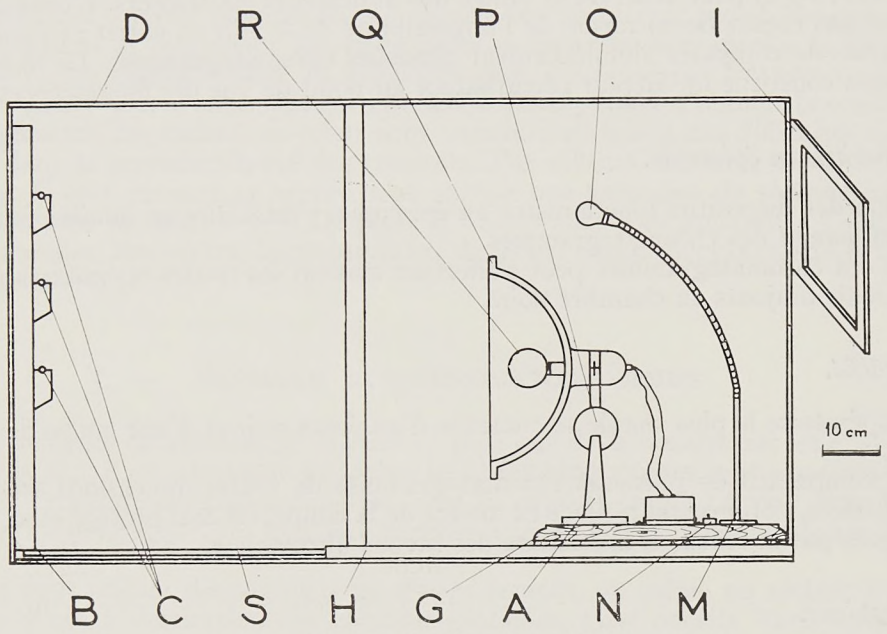


FIG. 2 *a*. — *Tunnel fluoriscopique. Vue en coupe*

Il est préférable d'utiliser le dispositif, qui vient d'être décrit, dans une chambre noire ou tout simplement dans une pièce dont la ou les fenêtres sont munies de volets convenablement agencés. Dans ce cas le « tunnel » facilite les observations des chromatogrammes par plusieurs personnes et évite la nécessité de disposer d'un nombre plus ou moins élevé de lunettes avec des verres jaunes.

Tour fluoriscopique.

Nous avons également mis au point un dispositif simplifié prévu pour le cas où le manque de place ne permet pas l'utilisation du « tunnel ». Ce dispositif, appelé « tour » ou « cheminée » fluoriscopique, se présente sous forme d'une pyramide tronquée à base carrée.

La construction de ces appareils fluoriscopiques a été effectuée à l'atelier de la Station.

γ — *Contrôle des lampes.*

Le contrôle de l'état de vieillissement des lampes constitue un problème important. Toutefois, les solutions proposées avec utilisation des substances colorantes de référence, comme le pinacyanol (JAULMES, NEY, 1960) et le malvoside, ne sont pas suffisantes, ni même efficaces.

A notre avis, le contrôle de la baisse du flux lumineux des lampes peut être réalisé au moyen d'un photomètre rudimentaire.

δ — *Défauts des lampes.*

Les lampes à vapeur de mercure, comportant une ampoule en verre de Wood, ont le défaut de donner une tache blanchâtre due à l'épaisseur moins prononcée du verre au sommet de l'ampoule. Nous avons cherché à utiliser les lampes fluorescentes linéaires produisant la lumière de Wood.

Les essais effectués ont montré l'insuffisance de l'excitation des fluorescences, ce qui, compte tenu des difficultés de l'installation des tubes fluorescents, nous a incité à abandonner la poursuite de notre expérimentation dans ce sens au profit de l'utilisation du tunnel et de la tour fluoriscopiques.

2) *Conditions optimales pour l'examen fluoriscopique des chromatogrammes*

Les chromatogrammes doivent être placés à une certaine distance de la lampe de Wood afin d'éviter leur échauffement préjudiciable à l'intégrité des taches de colorants. D'autre part, cette distance doit être fixe afin d'effectuer l'examen fluoriscopique toujours dans les mêmes conditions. Cette servitude exige le contrôle périodique de l'état du vieillissement de la lampe. Comme nous l'avons vu, la mise au point de ce contrôle reste à faire. Dans nos dispositifs les chromatogrammes sont placés à un mètre du sommet de la lampe.

La durée d'exposition aux rayons ultra violets constitue un facteur important. La fluorescence rose recherchée peut n'apparaître qu'au bout de 3 ou 4 mn après que la lampe de Wood ait atteint son régime ce qui demande au minimum 10 mn.

En général, on observe cette fluorescence rose dès le début, mais elle s'accentue, devient plus intense et plus nette au bout de 4 à 5 mn d'exposition. Cette exaltation de la fluorescence est reproductible. En réexaminant les mêmes chromatogrammes le lendemain on observe le même déroulement du phénomène.

En ce qui concerne la conservation des chromatogrammes, ils doivent être rangés à l'abri de la lumière entre des feuilles de papier noir, dans des boîtes en bois convenablement aménagées.

5. — L'efficacité du procédé fluoroscopique et les moyens de l'améliorer

La mise au point de l'appareillage, décrit précédemment, nous a permis d'aborder plus facilement l'étude de l'efficacité du procédé fluoriscopique au point de vue sensibilité. Cette dernière est conditionnée par la quantité des substances fluorescentes présentées dans les taches chromatographiques et, par conséquent, du volume du vin utilisé. Cela amène à dire que la nature des vins hybrides joue un rôle important. En plus, la richesse de ces vins en diglucosides dépend du cépage, de l'année de la récolte, des particularités géographiques et écologiques des vignobles.

La sensibilité du procédé fluoriscopique peut être affectée par la présence des substances pertubatrices telles que les sucres. En principe, il faudrait tenir compte des différents inhibiteurs et activateurs de la fluorescence, mais leur influence est peu connue pour être prise en considération dans le cadre de ce travail.

En premier lieu nous avons cherché à rendre plus rigoureuses les appréciations des intensités de la fluorescence rose.

1) *Evaluation des intensités de la fluorescence*

On conçoit facilement que l'évaluation des intensités fluorescentes peut être faite par rapport à un vin hybride choisi comme référence. Nous avons sélectionné le vin hybride rouge *Seyve et Villard 18315*, vinifié au laboratoire, en raison de sa fluorescence rose intense, quoique le cépage *Seibel 7053* ait pu convenir.

L'échelle de concentrations, s'étendant de 0,25 à 7 p. 100 de vin hybride, a été obtenue soit par le mélange d'un vin d'*Aramon* ou de *Carignan*, également vinifié au laboratoire, et du vin d'hybride mentionné, soit par une dilution de ce dernier dans une solution alcoolique de 10° contenant 2 g d'acide tartrique et 2 g de bitartrate de potassium et dont le pH est de 3. D'ailleurs l'emploi de la solution synthétique est à recommander tout particulièrement. Il va de soi que ces gammes de concentrations sont arbitraires puisque la teneur exacte en malvoside dans le vin hybride utilisé est inconnu et variable suivant l'année de récolte, le lieu d'origine et la vinification. Dans ces conditions il est indispensable de déterminer, au moins approximativement, la concentration du malvoside dans le vin de référence par rapport au malvoside d'une pureté connue. A cet effet, nous avons utilisé du chlorure de malvoside commercial de la Société Fluka (Buchs, Suisse).

Tout d'abord, nous avons déterminé le seuil de visibilité de la fluorescence rose du malvoside sur les chromatogrammes obtenus au moyen du procédé ascendant usuel (papier Arches 302 sol-

vant de BRITTON et ROBINSON). Les volumes chromatographiques utilisés de deux solutions de malvoside dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 dans l'eau et dans le méthanol étaient compris entre 5 et 30 µl. Ces solutions contenaient 100 mg. de chlorure de malvoside par litre. Pour ces deux solutions la fluorescence rose est nettement visible à partir du spot correspondant au volume 7,5 et même 5 micro-litres. Donc il est possible de déceler 0,5 µg de malvoside. Si la tache est faite, comme d'habitude, avec un volume de 50 µl, le procédé pourrait détecter, dans les conditions de notre mode opératoire, 10 mg de malvoside par litre de vin.

2) *Influence de quelques facteurs sur la sensibilité du procédé*

La sensibilité du procédé dépend de la richesse des vins en diglucosides et de la présence des glucides qui constituent un facteur perturbateur important.

α — *Richesse des vins en diglucosides*

Les résultats obtenus montrent toute la difficulté d'évaluer correctement les teneurs en diglucosides au moyen des comparaisons fluoriscopiques. Sans aucun doute, la séparation des diglucosides et leur dosage électrophotométrique serait une solution rationnelle du problème.

β — *Présence de glucides.*

Comme on le sait, la présence de glucides en grande quantité constitue un obstacle tant au point de vue de l'élaboration des chromatogrammes qu'au point de vue de leur développement.

Nous avons comparé le comportement fluoriscopique des vins secs, doux et des jus de raisin additionnés de vins ou de jus hybrides.

Par exemple, on décèle seulement 4 p. 100 de vin *Seyve-Villard 18315* dans un jus d'*Aramon* contenant 211 g de sucre par litre.

Tout d'abord on constate que la nature du vin et par conséquent sa richesse en diglucosides joue un rôle important. Ensuite on voit qu'une grande teneur en glucides ne permet pas une détection convenable des anthocyanes diglucosidiques.

Précisons que pour ces essais, nous avons utilisé les solvants suivants : le tampon de BRITTON et ROBINSON, la solution décinormale d'acide phosphorique, la solution centinormale d'acide trichloracétique.

Il ressort de ce qui précède que l'élimination des glucides et la concentration des substances colorées des vins, pauvres en diglucosides, est un problème important. A cela s'ajoute la nécessité d'améliorer la séparation de la tache chromatographique correspondant aux diglucosides.

3) *Moyens d'accroissement de la sensibilité*

Nous avons expérimenté en particulier la chromatographie ascendante bi-dimensionnelle simplifiée et l'isolement et la concentration des substances colorées à l'aide de l'acétate de plomb.

α — *Chromatographie sur papier ascendante bidimensionnelle simplifiée.*

La chromatographie sur papier ascendante simplifiée monodimensionnelle, utilisant le tampon de BRITTON et ROBINSON comme solvant de développement, ne permet pas la séparation convenable des substances colorées du vin. Le pouvoir séparateur de ce tampon est, en effet. médiocre. Or, il est important d'observer la fluorescence de la tache des diglucosides, complètement détachée des autres anthocyannes. A cet effet, nous avons essayé de transformer la technique unidimensionnelle habituelle en technique bidimensionnelle. Bien entendu, chaque feuille chromatographique correspond à un seul vin. Cette particularité constitue un inconvénient au premier abord.

La feuille de papier Arches 302 est découpée en carrés de 18 cm de côté. Les bords gauche et droit du carré correspondent à la largeur de la feuille, qui est le sens privilégié, le plus rapide (54 cm). La tache circulaire de départ (50 µl) est placée à l'angle du bas, à gauche, à 3 cm du bord gauche et à 3 cm également du bord inférieur comme le montre la figure 3. Une tache circulaire de 25 µl d'une solution du malvoside commercial à 200 mg par litre de méthanol, contenant 1 p. 100 d'acide chlodrhydrique concentré, est disposée au-dessus de la tache A dans la bande de 1 cm, entre le bord du carré et la ligne d'arrêt du front du solvant. Une tache semblable B est disposée à droite de la tache A dans les mêmes conditions. C'est un témoin pour le premier développement (n° 1), tandis que la première tache joue le même rôle pour le 2e développement (n° 2) (fig. 3).

Après le premier développement, la feuille est bien séchée, ensuite elle est tournée de 90° dans le sens contraire à la marche de l'aiguille d'une montre et soumise de nouveau à un autre développement au moyen du même solvant.

Finalement la tache des diglucosides, fluorescente en rose A′, se sépare de la tache principale et se trouve dans un carré défini, en général, par les ordonnées 2 et 6 et les abscisses 2 et 6 à l'intersection des parallèles correspondant à deux témoins B′ et C′.

C'est ainsi que l'on observe une tache fluorescente, due au malvoside, dans le carré 3-5, 3-5 correspondant à une prise d'essai chromatographique de 50 µl de mélange contenant 1 ml de solution de malvoside à 500 mg dans un litre de méthanol chlorhydrique à 1 p. 100 (370 CH_3OH : 10 HCl, V/V) et 9 ml de solution hydroalcoolique de pH3 (alcool 10°, acide tartrique-2 g, bitartrate de K-2 g, eau q.s.p. 1 000 ml).

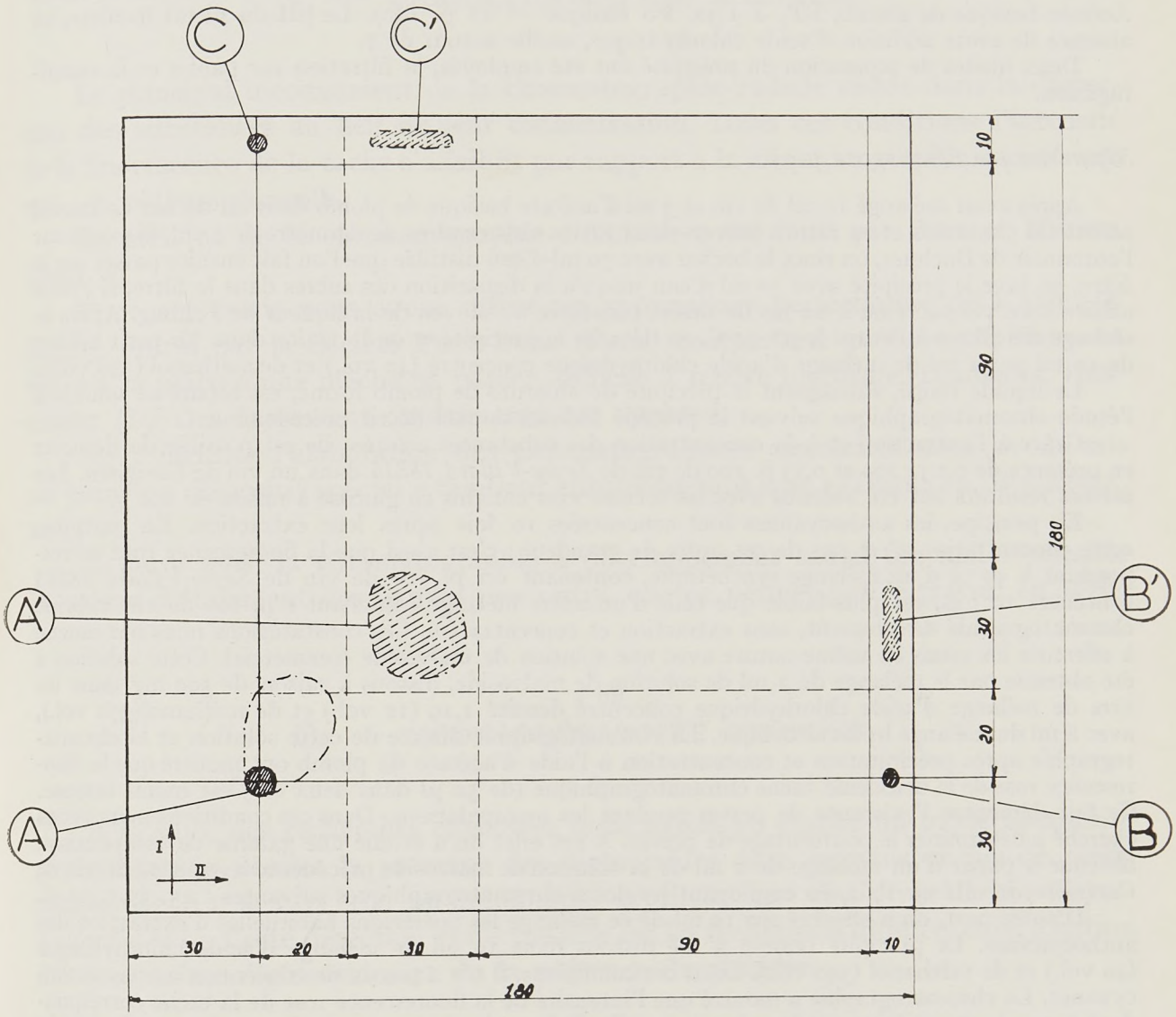


FIG. 3. — *Chromatogramme bidimensionnel.*

Nous avons également expérimenté le mélange à volumes égaux d'une solution de malvoside à 200 mg par litre de méthanol chlorhydrique à 1 p. 100 (méthanol : 370 ml, acide chlorhydrique concentré 10 ml) et d'une solution chlorhydrique de paeonoside. Ce dernier a été extrait des pétales de fleurs de Pivoine rouge (*Paeonia*) par macération dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 pendant 24 heures à raison de 1 g de pétales par 10 ml de solution (BATE-SMITH, 1951, HÄNSEL, 1959). Le pH apparent de cet extrait est voisin de 3,5. Finalement on a obtenu une seule tache douée d'une fluorescence rose orangée intense. La prise d'essai chromatographique était de 50 µl.

Les essais effectués avec les vins et les solutions synthétiques ont montré que la technique bidimensionnelle facilite l'observation de la fluorescence rose, mais ne permet pas d'abaisser le seuil de détection des diglucosides qui est de l'ordre de 0,5-1 p. 100 de vin hybride *Seyve-Villard 18315*. Comme la technique unidimensionnelle, elle reste défectueuse dans le cas des vins doux et des jus de raisin. Afin de remédier à ces insuffisances, nous avons fait appel à une extraction, suivie d'une concentration, des substances colorées, à l'aide d'acétate basique de plomb.

β — *Isolement et concentration des substances colorées à l'aide d'acétate de plomb.*

De nombreux essais nous ont amené à choisir une solution commerciale d'acétate basique de plomb plutôt que l'acétate neutre pour la séparation des anthocyannes des vins rouges. En effet, ce dernier sel n'assure pas la précipitation complète de ces composés. D'ailleurs, les résultats de l'expérimentation effectuée ont fait l'objet d'un mémoire spécial (DEIBNER, BOURZEIX, 1963). La précipitation presque complète des constituants colorés de 10 ml ou de jus de raisin est facilement obtenue par addition de 3 ml de solution commerciale d'acétate basique de plomb (Sté Prolabo, Acétate basique de plomb, RP, *d* 1,32, Pb basique — 10 p. 100). Le pH du filtrat incolore, en absence de toute addition d'acide chlorhydrique, oscille autour de 7.

Deux modes de séparation du précipité ont été employés, la filtration sur papier et la centrifugation.

Séparation par filtration sur papier.

Après avoir mélangé 10 ml de vin et 3 ml d'acétate basique de plomb dans un bécher de 100 ml on attend 5 minutes et on filtre à travers deux filtres sans cendres de diamètre de 7 cm, disposés sur l'entonnoir de Buchner, on rince le bécher avec 50 ml d'eau distillée que l'on fait ensuite passer sur le filtre, on lave le précipité avec 50 ml d'eau jusqu'à la disparition des sucres dans le filtre, si l'on a affaire à un vin sucré ou à un jus de raisin, constatée au moyen de la liqueur de Fehling. Après le séchage des filtres à l'étuve à 30°-35°C, on détache le précipité et on le traite dans un petit bécher de 10 ml par 1 ml de mélange d'acide chlorhydrique concentré (40 vol.) et de méthanol (340 vol.).

Le liquide rouge, surnageant le précipité de chlorure de plomb formé, est séparé et soumis à l'étude chromatographique suivant le procédé bidimensionnel décrit précédemment.

Grâce à l'extraction et à la concentration des substances colorées ile est possible de détecter en présence de 0,1 p. 100 et 0,25 p. 100 de vin de *Seyve-Villard 18315* dans un vin de *Carignan*. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les mêmes vins enrichis en glucose à raison de 200 g.

En principe, les anthocyannes sont concentrées 10 fois après leur extraction. En pratique, cette concentration n'est pas de cet ordre de grandeur ; c'est ainsi que la fluorescence rose correspondant à 50 µl d'un mélange synthétique, contenant 0,1 p. 100 de vin de *Seyve-Villard 18315* concentré 10 fois, est plus faible que celle d'un autre mélange contenant 1 p. 100 de vin hybride chromatographié directement, sans extraction et concentration. Ces constatations nous ont amené à effectuer les essais de même nature avec une solution de malvoside commercial. Cette solution a été obtenue par le mélange de 2 ml de solution de malvoside, dissous à raison de 500 mg dans un litre de mélange d'acide chlorhydrique concentré densité 1,19 (10 vol.) et de méthanol(370 vol.), avec 8 ml du mélange hydroalcoolique. La chromatographie directe de cette solution et la chromatographie après précipitation et concentration à l'aide d'acétate de plomb ont montré que la fluorescence rose de la deuxième tache chromatographique (de 50 µl dans deux cas) est moins intense. Ce fait démontre l'existence de pertes pendant les manipulations. Dans ces conditions nous avons cherché à déterminer le pourcentage de pertes. A cet effet on a étudié une gamme de comparaison obtenue à partir d'un mélange de 2 ml de la solution de malvoside précédente avec 8 ml de vin de *Carignan*, récolté en 1962, en employant les doses chromatographiques suivantes : 25, 37,5, 50 µl.

D'autre part, on a effectué sur 10 ml de ce mélange les opérations habituelles d'extraction des anthocyannes. Le précipité obtenu a été dissous dans 10 ml de mélange d'acide chlorhydrique (40 vol.) et de méthanol (340 vol.). Dans ces conditions, il n'y a pas eu de concentration des anthocyannes. La chromatographie a montré que l'intensité de la fluorescence rose de la tache correspondant à 50 µl est sensiblement la même que celle de la tache de la gamme de 25 µl, ce qui signifie que les pertes pendant la précipitation, la filtration, le lavage, le séchage et la dissolution du précipité est de l'ordre de 50 p. 100.

Dans ces conditions il fallait répondre à la question suivante : la centrifugation entraîne-t-elle des pertes moins sensibles ?

Séparation par centrifugation.

On utilise la même solution de malvoside (2 ml) mélangé au vin de *Carignan*, précédemment utilisé (8 ml).

On effectue la précipitation des anthocyannes suivant le mode opératoire décrit précédemment. Au lieu de filtrer on centrifuge pendant 10 mn à 4 500 tours mn, ensuite on élimine le liquide surnageant, on lave le précipité en le mettant en suspension dans 50 ml d'eau et on centrifuge 5 minutes.

Le précipité deshydraté au maximum est dissous dans 10 ml de mélange de méthanol (340 vol.) et d'acide chlorhydrique concentré (40 vol.) on effectue une centrifugation pendant 2 mn et on récupère le liquide rouge surnageant. Après la chromatographie ascendante bidimensionnelle les fluorescences des taches obtenues ont été confrontées avec les taches d'une échelle de comparaison.

Finalement on a reconnu que la centrifugation donne des résultats bien meilleurs puisque les pertes sont de l'ordre de 10-20 p. 100. Or, une nouvelle expérimentation a montré que ces pertes sont en réalité dues au fait qu'une perte du malvoside (10 p. 100) ne précipite pas dans les conditions de notre mode opératoire d'extraction des anthocyannes.

B. — CHROMATOGRAPHIE RADIALE

Le principal inconvénient de la chromatographie radiale réside dans la dispersion des substances au lieu de leur concentration. Dans ces conditions l'intensité de la fluorescence de la tache s'affaiblit par rapport à la chromatographie ascendante uni- et bidimensionnelle.

La critique de la chromatographie circulaire a été faite par BIOL et MICHEL (1961 *b*).

Pour nos essais nous avons utilisé un appareillage perfectionné de KAWERAU (1956), fourni par la Société Paris-Labo (Paris) comportant un tube capillaire en verre à la place d'une mêche en papier, difficile à rendre uniforme. D'ailleurs, BERGERET (1961) a largement expérimenté cet appareil.

Pour faciliter l'élaboration des chromatogrammes circulaires nous avons mis au point un dispositif spécial « tambour chromatographique » (DEIBNER, BOURZEIX, 1963 *a*).

A notre avis, la chromatographie à développement radial est moins sensible en raison d'étalement des bandes ; en outre, elle ne permet pas le travail en série.

C. — MODE OPÉRATOIRE PROPOSÉ

A la suite des recherches effectuées nous avons pu établir un mode opératoire permettant de déceler la présence des diglucosides dans les vins et jus de raisin rouges, de 0,1 à 1 p. 100 au minimum, exprimés en vins hybride de *Seyve-Villard 18315*. Cette détection s'effectue suivant les techniques différentes en fonction des teneurs en diglucosides et de la présence de glucides.

1. — DESCRIPTION

1) *Cas des vins secs ou peu sucrés contenant au moins 1 p. 100 de vin hybride*

— Pour ce travail courant on fait appel à la cuve de Shandon, par exemple. Pour les petits chromatogrammes la ligne de départ, tracé au crayon, est à 2 cm du bord inférieur du chromatogramme, l'autre trait est à 1 cm du bord supérieur, ceci pour matérialiser la ligne du front du solvant.

Si l'on utilise l'enceinte chromatographique composée (cylindre + cloche) on utilise des chromatogrammes de 37 × 16 cm, le côté le plus grand (direction privilégiée) étant destiné à être placé verticalement. Pour ce genre de chromatogrammes, la ligne de départ est à 5 cm du bord inférieur. Les bandes de départ ont une longueur de 2 cm et une largeur de 2,5 mm au maximum. La distance entre deux bandes est de 2 cm pour les chromatogrammes courts et de 3 cm pour les longs. La pose et le séchage des bandes ou des taches de départ s'effectuant au moyen de différents dispositifs (DEIBNER, BOURZEIX 1960 *a*, 1963 *b*). L'emploi des micropipettes de PLEUGER (83U020 n° B) de 2 microlitres rend aisée l'obtention des traits fins. On superpose les trainées de façon à avoir 50 µl par

bande. Cette quantité peut-être portée à 70-100 µl à la suite d'un premier résultat douteux. Comme solvant de développement, on utilise le tampon de BRITTON et ROBINSON. La solution centinormale d'acide trichloracétique (pH 2,10) est toute indiquée pour les chromatogrammes assez longs (45-50 cm). Les chromatogrammes, fixés à l'aide de pinces en acier inoxydable, sont plongés, par leur extrémité inférieure, d'un centimètre dans le solvant. L'enceinte étant close, on laisse le solvant monter jusqu'au trait supérieur ce qui demande 2-3 heures. Les chromatogrammes égouttés (cette opération est facilitée par l'emploi de la double potence décrite précédemment) sont séchés dans une étuve ventilée, portée à 30°C, pendant 10-15 mn.

Les taches chromatographiques sont examinées en lumière de Wood à l'aide des dispositifs spéciaux décrits précédemment. La lampe de Wood doit être en circuit depuis 10 mn au moins. Après 3-4 mn d'exposition les chromatogrammes sont examinés. La fluorescence rouge brique plus ou moins prononcée, à la hauteur de la tache de diglucosides, indique la présence des vins hybrides. La détection peut-être rendus semi-quantitative en comparant les intensités des fluorescences avec celles fournies par une échelle des solutions de malvoside commercial concernant 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg par litre d'une solution alcoolique de 10° contenant 2 g d'acide tartrique et 2 g de bitartrate de potassium.

2) *Cas des vins doux et des jus de raisin*

Les glucides constituent un facteur perturbateur. Leur présence peut être tolérée jusqu'à une teneur de 50-60 g par litre. Leur élimination est obtenue à l'aide d'acétate basique de plomb, de densité 1,23. A cet effet, 10 ml de vin ou de jus de raisin sont additionnés de 3 ml d'acétate de plomb. Après agitation et attente de 15 mn le mélange est soumis à la centrifugation durant 15 mn, à 5 000 tours/mn. On lave le précipité, à deux reprises, avec 50 ml d'eau distillée, on centrifuge chaque fois pendant 5 mn. Le précipité bien égoutté est traité par 10 ml de méthanol chlorhydrique à 4 p. 100 (méthanol 340 ml, acide chlorhydrique *d* 1,19-40 ml) ou par 1 ml de cette solution, si l'on cherche à concentrer les anthocyanes séparées. La fluorescence des taches chromatographiques peut-être comparée à celle d'une même gamme des solutions de malvoside dissous cette fois-ci dans le méthanol chlorhydrique à 1 p. 100 (méthanol 370 ml, acide chlorhydrique 10 ml). En cas de besoin, pour réussir les comparaisons quantitatives, il est nécessaire de diluer le vin ou préparer les solutions témoins plus concentrées. Il ne faut pas oublier que l'extraction des anthocyannes accuse un déficit de 10 p. 100 en malvoside et en paeonoside et que, si l'on a recours à la filtration au lieu de centrifugation, les pertes sont de l'ordre de 50 p. 100. Dans ce dernier cas la concentration des anthocyannes est de l'ordre de 5 au lieu de 10.

3) *Cas des vins ou des jus de raisin pauvres en diglucosides*

La chromatographie ascendante bidimensionnelle convient parfaitement à la détection de petites quantités des diglucosides. Son utilisation pour le travail en série est au premier abord moins commode puisqu'il faut employer une feuille chromatographique par vin. Mais le procédé est plus sûr, plus net, ce qui milite en faveur de son emploi courant.

Précédemment, nous avons exposé les modalités d'élaboration des chromatogrammes bidimensionnels, le premier développement étant fait dans le sens privilégié (sens de la largeur de la feuille commerciale, soit la dimension de 54 cm). Sur chaque carré de feuille, 18 × 18 cm, la tache de départ, correspondant au volume minimal de 50 µl, est placée à 3 cm du bord inférieur et à 3 cm également du bord gauche ; deux lignes sont disposées à 1 cm des bords droit et supérieur indiquant l'arrêt des fronts du solvant, la ligne supérieure étant relative au premier développement. Deux témoins, chacunde 25 µl d'une solution de malvoside commercial dans le mélange d'acide chlorhydrique concentré (10 vol.) et du méthanol (370 vol.) à raison de 200 mg par litre, sont disposés l'une à 3 cm du bord gauche dans la bande de 1 cm, l'autre à 3 cm du bord inférieur dans une autre bande de 1 cm, comme le montre la figure 3. On plonge le chromatogramme à un cm dans le tampon de BRITTON-ROBINSON et on l'isole dans l'enceinte chromatographique. Le développement dure environ 1 heure, la distance parcourue par le solvant étant de 16 cm. Après l'égouttage, qui demande 5 à 10 mn, le chromatogramme est séché dans l'étuve ventilée à 30°C pendant 20 mn. Il est essentiel de la bien sécher, car au cours du 2e développement, le front du solvant ne serait pas horizontal, par suite de la plus grande rapidité de l'ascension dans la partie restée éventuellement humide. Compte tenu de la durée du deuxième développement et du séchage, la durée totale de l'opération est de 3 heures.

Au cours de deux développements, la tache de diglucosides se détache du reste des anthocyannes et se place dans un carré dont les coordonnées sont comprises entre 2 et 6 (exprimées en cm, l'origine étant à la tache de départ).

Nous utilisons, pour mieux observer la fluorescence rose de la tache de diglucoside, une pochette-comparateur représentée sur la figure 4. Cette pochette est constituée par une double feuille en papier noir assez rigide dont les dimensions correspondent à celles du chromatogramme, 18 × 18 cm. La partie droite possède un pli 2 dans lequel est fixé le chromatogramme. L'ouverture 8 correspond à l'ouverture 7 de l'autre feuille avec une seule différence qu'une moitié de l'ouverture 7 est obturée avec un carré de papier blanc Arches 302 convenablement collé. En rabattant la feuille gauche sur le chromatogramme il est possible de voir seulement la partie du chromatogramme où se trouve l'éventuelle tache des diglucosides et d'apprécier sa fluorescence par rapport à la surface *b* blanche qui obstrue la moitié de l'ouverture 7. On peut également voir les témoins par les fenêtres 3 et 5. Quant aux fenêtres 4, 6 et 8 de la feuille droite, elles évitent le contact avec le fond noir sous les taches témoins. L'emploi du papier noir améliore l'observation des fluorescences, alors que celui du

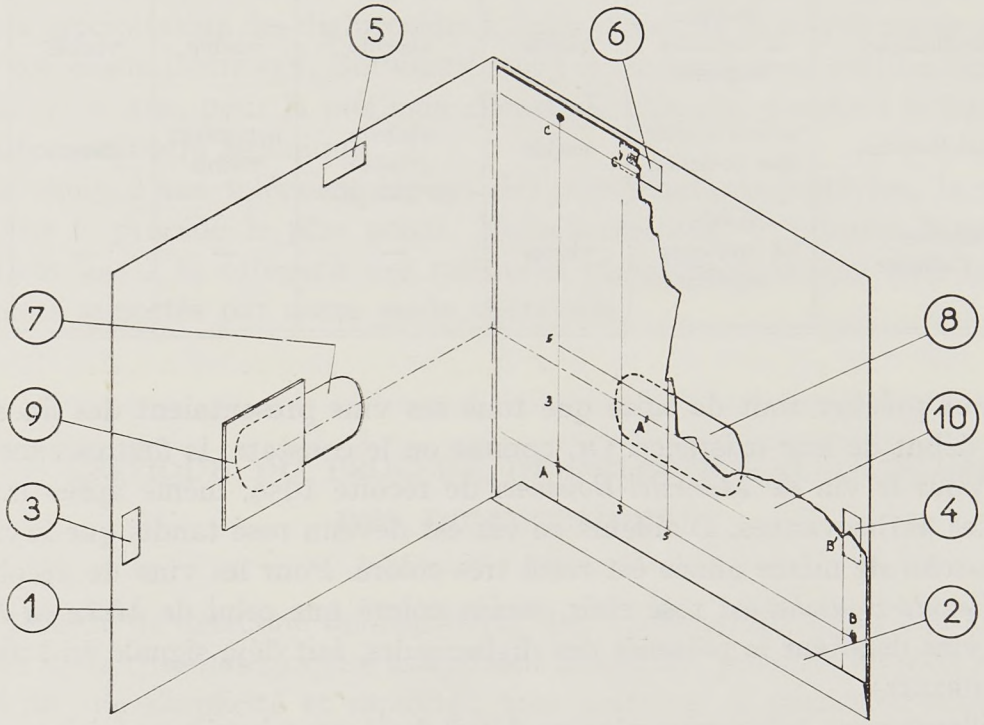


FIG. 4. — *Pochette-comparateur facilitant l'examen fluoriscopique du chromatogramme bidimensionnel*

papier blanc donne de mauvais résultats à ce point de vue. On pourrait imaginer la comparaison semi-quantitative de la fluorescence avec celles des taches obtenues à partir des solutions de malvoside de différentes concentrations, les carrés correspondants étant fixés à droite de l'ouverture 7. Mais cette opération est rentable seulement dans les cas de contestation, tout à fait particuliers.

2. — RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons utilisé la chromatographie ascendante bidimensionnelle, avec ou sans concentration des substances colorées, pour la recherche des diglucosides, dans les vins métis de *Vitis vinifera*, à savoir dans les vins d'*Alicante-Bouschet*, de *Morastel-Bouschet* et de *Grand-Noir de la Calmette*. Ces vins ont été obtenus au laboratoire à partir des raisins cueillis à Arzens (Aude). Les vinifications, d'une durée de 21 jours pour chaque vin, ont été faites par nos soins à la Station, sans l'emploi de l'anhydride sulfureux, sauf pour les vins de la récolte 1959 dont les moûts ont été sulfités à raison de 70 mg d'anhydride par litre.

Les résultats des essais chromatographiques, effectués au mois de juin 1962, sont consignés dans le tableau 1.

TABLEAU I

Rèsultats de l'examen des taches fluorescentes roses.
Date des essais chromatographiques, juin 1962

Nature du vin	Récolte 1961		Récolte 1960		Récolte 1959	
	Normal	Concentré	Normal	Concentré	Normal	Concentré
Alicante-Bouschet	faible, à contours imprécis	visible	absente	visible	visible	nettement visible
Morastel-Bouschet	mieux visible que ci-dessus	visible	absente (visible p. 100 µl)	nettement visible	absente	absente
Grand-Noir de la Calmette	faible, à contours imprécis	visible	—	—	—	—

Il faut préciser tout de suite que tous ces vins présentaient des fluorescences roses au début de leur existence. Or, comme on le constate, la fluorescence rose est absente pour le vin de *Morastel-Bouschet* de récolte 1959, même après la concentration des anthocyannes. D'ailleurs ce vin est devenu rosé tandis que le vin d'*Alicante-Bouschet* de même année est resté très coloré. Pour les vins de récolte 1960, le vin *Alicante-Bouschet* est rosé clair, moins coloré que celui de *Morastel-Bouschet*.

Ces vins dénotent la présence des diglucosides, fait déjà signalé en 1960 (Deibner, Bourzeix).

D'ailleurs nous exposerons plus en détail dans un mémoire spécial nos constations en ce qui concerne la présence des diglucosides dans les vins issus des raisins métis de *Vitis vinifera*.

3. — Valeur analytique de différentes techniques de détection des diglucosides

La sensibilité de la détection des diglucosides et, en particulier, du malvoside, en lumière ultraviolette est fixée conventionnellement dans les différentes techniques à un pourcentage minimal au-dessus duquel l'application serait aléatoire ou inutile : quelques p. 100 pour P. Ribéreau-Gayon (1960), 3 p. 100 pour Jaulmes et Ney (1960), 10 p. 100 pour Rentschler et Tanner (1959, 1960), 0,25 p. 100 pour Rentschler, Tanner et Brunner (1961), 1,5 p. 100 pour Fernandès (1958), 1 p. 100 pour Mlle Coux et Vitte (1960). Le procédé de Bieber (1960) permet de détecter jusqu'à 20 mg de malvoside par litre ce qui correspond à 2 µg dans une prise d'essai chromatographique de 0,1 ml.

La méthode allemande officielle (1961) est susceptible de détecter 0,5 µg, le volume chromatographique étant de 10 µl, ce qui correspond à 2,5 mg de malvoside par litre, après la concentration des anthocyannes de 10 fois. Sengewal (1961) préconise la concentration de 20 fois.

En ce qui concerne notre mode opératoire, ne comportant pas la concentration des anthocyannes, il détecte 0,5 p. 100 de vin hybride, Nous avons constaté qu'il est possible de voir la fluorescence de 0,5 µg de malvoside. Si la tache chromatographique est faite avec un volume chromatographique de 50 µl, notre procédé peut déceler jusqu'à 10 mg de malvoside par litre. En faisant appel à la concentration des anthocyannes qui est de l'ordre de 10 fois, notre technique, utilisant la chromatographie bidimensionnelle, peut apprécier 1 mg de malvoside dans un litre.

Mais comme nous l'avons vu précédemment, il faut tenir compte que le rendement de la précipitation des diglucosides à l'aide d'acétate de plomb est de 90 p. 100. D'après nos essais (DEIBNER, BOURZEIX, 1963 *b*), ce rendement est bien moindre, de l'ordre de 50 p. 100, pour la méthode allemande officielle, pourtant beaucoup plus compliquée que notre technique.

Si le choix d'une tolérance dépend des considérations pratiques, la recherche doit choisir le procédé le plus précis. Malheureusement le procédé fluoriscopique n'appartient pas à la catégorie des méthodes rigoureuses, malgré tous les perfectionnements apportés par notre mode opératoire.

D. — CRITIQUE DU PROCÉDÉ DE DÉTECTION FLUORISCOPIQUE DES DIGLUCOSIDES

Le procédé de détection fluoriscopique des diglucosides, après leur séparation au moyen de la chromatographie ascendante simplifiée, présente de réels avantages au point de vue simplicité et rapidité ; très pratique, il permet d'examiner les taches chromatographiques sans détériorer les colorants. Mais ce procédé a également des inconvénients très importants. Tout d'abord il ne repose pas sur des bases très sûres, les causes des phénomènes étant imparfaitement connues. En plus l'examen fluoriscopique dépend des différents facteurs (nature du papier, son état, pH etc.) et peut être faussé par les variations de la fluorescence au cours des manipulations, par la superposition des couleurs, par l'atténuation ou l'exaltation de la fluorescence par suite de l'influence, insuffisamment étudiée, des inhibiteurs et des activateurs, En premier lieu l'existence de deux diglucosides principaux, malvoside et paeonoside. qui donnent des taches de même Rf et des fluorescences de couleurs différentes en lumière de Wood, rend très difficile leur évaluation même semi-quantitative, très approchée. Quant aux diglucosides acylés, possédant une fluorescence rose et les Rf plus élevés, ils ne rentrent pas en ligne de compte puisqu'ils ne se trouvent pas dans la zone de la tache chromatographique des diglucosides. A cause de ces incertitudes, la méthode fluoriscopique, actuellement utilisée pour la détection des diglucosides, constitue en principe une méthode auxilliaire et additionnelle, en attendant la mise au point d'une méthode définitive, plus précise. A notre avis, cette méthode appartiendra à la catégorie des méthodes électrophotométriques. Appliquée aux solutions des anthocyannes diglucosidiques, préalablement séparées chromatographiquement, elle permettra de nous mieux renseigner sur les teneurs de ces substances dans le raisin, le jus et le vin.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Depuis la publication du procédé de P. Ribéreau-Gayon (1953), la détection des diglucosides anthocyanniques et, en particulier, du malvoside dans les vins rouges, au moyen de la chromatographie ascendante sur papier et de la fluoriscopie des taches obtenues, a fait l'objet de nombreux travaux français et étrangers entrepris en raison de la nécessité de répondre aux exigences du contrôle exercé sur les vins exportés en Allemagne. En effet, la technique initiale de P. Ribéreau-Gayon, modifiée par Marichal (1956), ne permettait pas la détection des diglucosides avec une précision suffisante. Certes, la technique française, codifiée par les soins de Jaulmes et Ney (1960), a apporté des améliorations nécessaires sans, toutefois, épuiser toutes les possibilités analytiques. Dans ces conditions nous avons été amenés à rechercher les moyens d'améliorer les techniques existantes.

Les études effectuées depuis 1959 ont abouti à la mise au point d'un mode opératoire perfectionné au point de vue de la rapidité des manipulations et de la précision des observations en lumière ultra-violette, dues à l'emploi des appareils permettant la pose facile et le séchage rapide des taches de départ sur les chromatogrammes (« orgues chromatographiques ») et des dispositifs destinés à rendre aisé l'examen fluoriscopique des taches (« tunnel et cheminée fluoriscopiques »). De sorte que notre technique est en mesure de déceler 0,5 p. 100 d'hybride, *Seyve-Villard 18315*, dans le vin ou 10 mg de malvoside par litre. Le problème de la séparation et de la concentration des anthocyannes dans les vins pauvres en diglucosides ainsi que dans les vins doux et les jus de raisin, les glucides étant le facteur perturbateur, a été résolu grâce à l'utilisation d'une solution commerciale d'acétate basique de plomb comme agent de précipitation, avec un rendement de 90 p. 100. Quant à la concentration des anthocyannes, elle est de l'ordre de 10 fois. En plus, la mise au point de la chromatographie ascendante bidimensionnelle, utilisant le même solvant de Britton et Robinson, constitue une amélioration sensible, facilitant une séparation nette de la tache chromatographique des diglucosides. Le papier chromatographique Arches 302 se prête bien à cette opération puisqu'il possède, comme nous l'avons constaté, un sens privilégié suivant la plus petite dimension (54 cm) de la feuille commerciale. Toutes ces particularités du mode opératoire élaboré ont fourni le moyen de déceler 0,1 p. 100 d'hybride ou 1 mg de malvoside par litre. Dans ces conditions notre technique est plus efficace que le procédé allemand officiel préconisant les nombreuses opérations analytiques responsables, comme nous l'avons montré précédemment (Deibner, Bourzeix, 1963 *b*), de pertes importantes en anthocyannes diglucosides.

Malgré tous ces perfectionnements, la détection des diglucosides au moyen de la chromatographie sur papier et de la fluoriscopie des taches n'est pas capable d'apporter une contribution décisive à la séparation et au dosage de ces substances. D'autres recherches seront nécessaires pour résoudre ce problème analytique.

Reçu pour publication en février 1964.

SUMMARY

THE DETECTION OF ANTHOCYANIN DIGLUCOSIDES IN WINES AND GRAPE JUICE BY PAPER CHROMATOGRAPHY AND FLUOROSCOPIC EXAMINATION OF THE SPOTS OBTAINED

The detection of anthocyanin diglucosides in wines and grape juice was of great practical and scientific interest.

Seeking to improve on existing techniques, this study had made from the beginning an original contribution to the devices employed in the preparation of chromatograms (« the chromatographic organ »), their development (the chromatograph chamber, the movable tube carrier support), the fluoroscopic detection of diglucoside spots (« tunnel or chimney fluoroscopic »). In the second place the research for small quantities of diglucosides and the elimination of the interference effects of the carbohydrates had benefitted both from the advantages of ascending two-dimensional chromatography with the same BRITTON and ROBINSON solvent and from the extraction of the anthocyanins with the aid of basic lead acetate, followed by their concentration in solution. The method of operation established permitted the identification of up to 0.1 % of hybrid wine or 1 mg of malvin per litre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME 1961. Détection des hybrides rouges dans le vin et les moûts (Titre traduit). *Bundesgesundheitsblatt*, n° 2427, 27 janvier.

BATE-SMITH E., 1948 *a*. Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. *Nature*, **161**, 835.

BATE-SMITH E., 1948 *b*. Anthocyanins and flavones. *Biochem. J.*, **43**.

BATE-SMITH E., 1951. Partition chromatography. *Bioch. Soc. Symposium*, **3**, 68, Cambridge.

BATE-SMITH E., WESTALL R., 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure of some naturally occuring phenolic substances. *Biochem. Biophys. Acta*, **4**, 427.

BERGERET J., 1961. Sur la séparation des pigments anthocyaniques du vin par chromatographie circulaire sur papier. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 844.

BIEBER M., 1960. Der papierchromatographische Nachweis von roten Hybridenfarbstoff. *Deutsch. Wein-Zeitung, Wein und Rebe*, **961**, n° 6, 104.

BIOL M., MICHEL A., 1961 *a*. Chromatographie sur papier des matières colorantes des vins rouges. *Ann. Technol. Agr.*, **10**, 319.

BIOL M., MICHEL A., 1961 *b*. Techniques chromatographiques appliquées à la différenciation des matières colorantes des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 325.

BOULANGER P., BIZERTE G., 1959. Chromatographie de partage sur papier in LEDERER E. *Chromatographie en chimie org. et biol.*, **1**, 191, Masson, Paris.

COUX C. Mlle, VITTE G., 1960. Sur la recherche de vin provenant d'hybride. Société de Pharm. Bordeaux, Séance du 7 déc. (d'après *Ann. Pharm. Fr.*, 1961, **19**, 237).

DEIBNER L., 1951. Dispositif permettant l'observation aisée, à la température normale, du virage des indicateurs fluorescents en lumière de Wood ainsi que la lecture facile dans l'obscurité des volumes sur les microburettes. *Chim. Anal.*, **33**, n° 12, 345.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960 *a*. Sur les incertitudes dans la différenciation des cépages *Vitis vinifera* et Hybrides rouges par chromatographie sur papier de leurs substances colorantes. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **46**, n° 16, 968.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960 *b*. Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 4, 409.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963 *a*. Dispositifs pour la préparation rapide des chromatogrammes à développement radial et classique. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 141-152.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963 *b*. Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 4, 287-312.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964. État actuel de la détection des anthocyannes diglucosides dans les vins et les jus de raisin. *Ann. Fals Fraudes Exp. Chem.* (*A paraître.*)

FERNANDÉS A., 1958. Antocianinas das uva e dos vinhos. Contribuição para o sen estudos por cromatografia em papel. Relatorio final do curso, *Inst. Sup. Agron. Lisboa.*

HÄNSEL R., 1959. Zellsartllösliche Pigmente (Anthocyane und Flavonoïde) in LISKENS M. *Papierchromatographie in der Botanik*, 288-289, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

HARBORNE J., 1958 *a*. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatogr.*, **1**, 473.

HARBORNE J., 1958 *b*. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.*, **70**, 22.

HUYBRECHTS M., 1947. *Le pH et sa mesure. Les potentiels d'oxydoréduction, le rH.* 199. Masson éd. Paris.

JAULMES P., NEY, 1960. Recherche des vins d'Hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Fals. Fraudes,* **53**, 180.

KAWERAU, 1956. *Chromatographic Methods,* **1**, n° 2, 7-8.

MARICHAL M., 1956 *a*. Caractérisation des vins issus d'hybrides producteurs directs par chromatographie simplifiée. *Ann. Fals. Fraudes,* **149**, 155.

MARICHAL M., 1956 *b*. Idem. *Progr. Agric. Vit.*, **146**, 80.

RENTSCHLER M., TANNER M., 1959. Beitrag zur charakterisierung der Farbstoffe von blauen Trauben und zum Nachweis von Hybriden Weinen. *Trav. Chim. Alim., Hyg.*, **50**, 533.

RENTSCHLER M., TANNER M., 1960. Erganzungen zum Nachweis von Hybridentraubensäften und Weinen. *Ibid.*, **51**, 118.

RENTSCHLER M., TANNER M., BRUNNER M., 1961. Zur Identifizierung der für rote Hybridentraubensäfte und Weine charakteristischen Anthocyannfarbstoffe. *Trav. Chim. Alim. Hyg.*, **52**, 312.

RIBÉREAU-GAYON P., 1953. Différenciation des matières colorantes des raisins et des vins des cépages français et hybrides. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **39**, 800.

RIBÉREAU-GAYON P., 1954 *a*. Étude de la matière colorante des raisins rouges : application à la différenciation des cépages et des vins. *Ann. Fals. Fraudes,* **47**, 436.

RIBÉREAU-GAYON P., 1954 *b*. *Diplôme d'Études Supérieures, Bordeaux.*

RIBÉREAU-GAYON P., 1956. Observations sur la différenciation de la matière colorante des vins rouges. *Ann. Fals. Fraudes,* **49**, 381.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959 *a*. Recherches sur les anthocyannes des végétaux ; Application au genre *Vitis. Thèse Sci. Bordeaux.*

RIBÉREAU-GAYON P., 1959 *b*. Idem. *Rev. Gén. Bot. Fr.*, **66**, n° 782, 531.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959 *c*. Anthocyanins of grapes. *Qual. Plant. Materiae Vegt.*, **3-4**, 491.

RIBÉREAU-GAYON P., 1960 *a*. Untersuchungen über die Farbstoffe roter Trauben. *Deutsche Lebensmittel Rundschau,* n° 8, 217.

RIBÉREAU-GAYON P., 1960 *b*. Les anthocyannes du genre *Vitis.*, Application à la différenciation des vins. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **250**, 591.

RIBÉREAU-GAYON J., RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Les anthocyannes du vin. *Xe Congrès Intern. Ind. Agric. et Alim.*, Madrid, juin.

RIBÉREAU-GAYON J., RIBÉREAU-GAYON P., 1598. The anthocyans and leucoanthocyans of grapes and wines. *Amer. J. Enol.*, **9**, 1.

SASTRY L., 1951. Nature of the pigments in *Concord* grape and their behaviour during heat processing and storage. *Thèse, Ames (U. S. A.), State Coll.*

SASTRY L., TISCHER R., 1952*a*. Stability of the anthocyanin pigments in *Concord* grape juice. *Food Techn.*, **6**, 269.

SASTRY L., TISCHER R., 1952*b*. Behaviour of the anthocyanin during heat processing and storages. *Food Res.*, **6**, 82.

SENGEWALD M., 1961. Untersuchungen über die Anthocyane inbesondere über das Malvin. Beitrag zur Kenntnis der Papierchromatographie, Gewinnung und Eigenschaften der Anthocyane. *Dissert. Frankfurt am Main.*

STARON T., 1961. Une nouvelle méthode de chromatographie de partage sur papier préalablement imprégné avec une solution de cyclohexanol ou de ses dérivés méthylés. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **253**, 1447.

Ann. Technol. agric., 1962, **13** (3) 283-300.

LES LEVURES ALCOOLIQUES DANS LES VINS PROTÉOLYSE ET PROTÉOGÉNÈSE

C. FLANZY, Ch. POUX, M. FLANZY
avec la collaboration technique de Modeste CAILLET

Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Les auteurs poursuivant leurs recherches sur l'évolution de l'azote dans les moûts et les vins sous l'influence des levures alcooliques étudient tout spécialement l'évolution de l'azote exogène apporté sous forme de sels ammoniacaux à des doses élevées. A cet effet, ils examinent la composition finale.

I. — INTRODUCTION

Dans un travail précédent, les auteurs avaient étudié la variation de différentes formes d'azote, en particulier des acides aminés lors de la transformation du moût en vin, tout d'abord dès après la fermentation alcoolique, ensuite au cours de l'autolyse des levures. Cette autolyse était réalisée par contact plus ou moins prolongé du vin avec sa lie.

La source d'azote était alors exclusivement endogène étant constituée par l'azote du moût de raisin.

Les auteurs avaient alors montré qu'en laissant en contact le vin et les levures pendant un temps plus ou moins prolongé, le vin s'enrichissait en azote, sans toutefois atteindre la quantité initiale contenue dans le moût.

Cet enrichissement en N soluble fut trouvé maximum entre le 1er et le 2e mois de ce contact, dans les conditions de ces essais.

Dans le détail, il s'agissait : d'une part de la disparition de certains acides aminés : arginine, phénylalanine, histidine ; d'autre part, d'un accroissement très important des autres et, en particulier, du glycocolle et des acides aminés soufrés : cystine, méthionine.

Sur le plan technologique proprement dit et dans les limites de temps bien définies, une amélioration gustative des vins était obtenue.

Ainsi se trouvait réalisé globalement, par action autolysante, un enrichissement du vin en acides aminés complétant une heureuse amélioration gustative.

Dans une deuxième étape il s'agissait d'établir la limite de cet enrichissement en partant de doses croissantes d'apport exogène de NH_4^+. C'est l'objet du présent mémoire.

II. — EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES

La matière première servant de base à ces nouveaux essais était constituée par deux moûts de *Vitis vinifera* :

— Un moût de *Terret-Bourret* de la récolte 1962 du Domaine de Pech Rouge (I. N. R. A., Narbonne), identique à celui du travail précédent sur la protéolyse (POUX, FLANZY C., FLANZY M., 1964). Il contenait par litre :

Matières réductrices en glucose	195 g
Azote total (en N)	196 mg
Azote ammoniacal (en N)	8 mg

— Un moût de *Grenache* surmûri de la récolte 1962 ayant même provenance. Il contenait par litre :

Matières réductrices en glucose	350 g
Azote total (en N)	143 mg
Azote ammoniacal (en N)	21 mg

Ces moûts ont été enrichis de doses croissantes de N sous forme de sels ammoniacaux : tartrate d'ammonium (série T), phosphate biammonique (série P), sulfate d'ammonium (série S). Pour le cépage *Terret-Bourret*, ces additions correspondent à 500, 750 et 1 000 mg N/litre et constituent les essais T 1, T 2, T 3 ; P 1, P 2, P 3 ; S 1, S 2, S 3. En plus, l'essai S 2 (à 750 mg de N) a été répété, mais avec aération, constituant ainsi l'essai S. A. On a donc pour le *Terret-Bourret*, en comptant le témoin, *11 essais*.

Tous ces essais ont été ensemencés avec la même culture de *Saccharomyces ellipsoideus* à raison de 1.10^6 germes au ml.

Pour le cépage *Grenache*, les additions correspondent à deux doses de N : 500 et 750 mg N/litre. On a donc les essais T 1, T 2 ; P 1, P 2 ; S 1, S 2. En outre l'essai S 1 a été répété, mais avec aération constituant ainsi l'essai S. A. On a donc pour le *Grenache*, en comptant le témoin, 8 essais.

L'ensemencement a été effectué ici à raison de 2.10^6 germes au ml.

L'ensemble de ces essais a été mis en chambre de fermentation à la température de 25°C. Celle-ci était terminée pour tous les essais au bout de 10 jours, sauf pour le témoin du *Grenache* pour lequel elle a duré 30 jours. Pour tous ces vins, sauf pour le témoin *Grenache*, il a été effectué un soutirage au bout de 10 jours afin de séparer le vin des lies et ainsi limiter au maximum l'action de l'autolyse des levures.

Ces doses de N, élevées, anormales, ont été choisies de telle manière qu'il reste toujours un excès de NH_4^+ dans le vin après fermentation. Elles ont été utilisées uniquement à titre expérimental pour l'étude du potentiel « aminogène » des levures alcooliques. Elles n'ont par conséquent rien de commun avec les doses utilisées dans la pratique. Il est d'ailleurs évident que cet excès d'ammonium rend ces vins non commercialisables. Mais il était fondamental de s'assurer jusqu'à quelle limite la levure alcoolique utilisée peut synthétiser des acides aminés compte tenu de notre constitution de milieu.

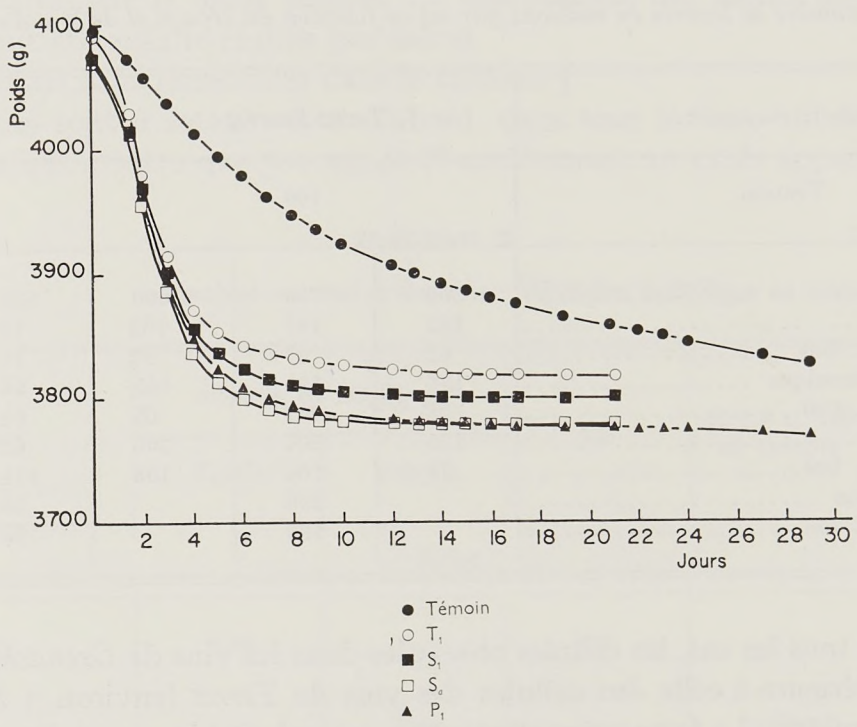
III. — RÉSULTATS

A. — Influence des sels ammoniacaux sur la vitesse de fermentation, et la population des levures

Cette influence a déjà fait l'objet, parmi beaucoup d'autres, d'une étude déjà ancienne de l'un d'entre nous (FLANZY, de SÈZE, 1937), (FLANZY, de SÈZE, LAMAZOU-BETBEDER Marie, 1936), où l'effet stimulant des additions ammoniacales était particulièrement net sur la vitesse de fermentation.

Cependant, dans ces essais, les doses d'azote ajoutées étaient de l'ordre de 42 mg/l. Avec les doses anormales (10 et même 20 fois supérieures) expérimentées au cours de ce travail, on trouve toujours cet effet stimulant sur la vitesse de fermentation. Le graphique 1 fournit, pour le *Grenache*, un exemple remarquable.

Dans ce graphique 1 on a porté en ordonnée les variations de poids des flacons évitant ainsi les prélèvements successifs pour mesurer densité et sucres, ce qui aurait modifié chaque fois les conditions expérimentales.



Alors que l'on peut considérer la fermentation comme pratiquement stabilisée en 10 jours, pour des essais avec addition de NH_4^+, elle est encore sensible dans le témoin au 30e jour de fermentation. Ici c'est l'essai au phosphate d'ammoniaque qui a été le plus rapide ; mais il n'en est pas toujours de même. De toute façon l'influence de l'anion reste très faible lorsqu'elle existe. Ceci confirme ce que l'un de nous avait constaté en 1936.

Ce qui est nouveau et intéressant à noter, c'est l'indifférence de l'allure de la fermentation, alcoolique aux fortes doses de N. Ceci signifierait, ou que la dose de N, même à 1,00 g/l n'était pas du tout déprimante pour la levure, ou bien, qu'en la matière, NH_4^+ n'a aucune action toxique vis-à-vis des races de levures du milieu expérimenté.

Sur la population nous constatons que l'addition de sels ammoniacaux a favorisé la multiplication cellulaire, ce qui est banal. Le tableau 1 rend compte de ces observations :

Mais quand on entre dans le détail de cet accroissement, on note des faits intéressants.

Tout d'abord, la quantité de levures est plus élevée avec l'essai *Terret* qu'avec celui du *Grenache*. Si l'on considère le taux de prolifération de la population, il est délicat de noter une différence entre *Grenache* et *Terret*, car les variations sont alter-

nées. De même, si l'aération paraît avoir un effet nettement favorable dans le cas du *Terret*, il n'en est plus de même pour le *Grenache*.

Ensuite, l'anion SO_4^{--} paraît se distinguer des autres, car il provoque les accroissements les plus élevés. Il sera intéressant de préciser ultérieurement si c'est l'anion SO_4^{--} ou son composant S qui est à l'origine de cet accroissement.

Les observations concernant la *morphologie des levures* dans l'un et l'autre cas méritent réflexion.

TABLEAU I

Population : nombre de levures en millions par ml en fonction du cépage et de la nature de l'anion

Nature du moût	*Terret-Bourret*			*Grenache*	
Témoin	100			28,5	
Doses de N ajoutées en mg/l	500	750	1 000	500	750
Tartrate	162	187	192	49	49
Accroissement p. 100	62	87	92	71	71
Phosphate biammonique	136	151	165	46	49
Accroissement p. 100	36	51	65	64	71
Sulfate	175	204	206	61	72
Accroissement p. 100	75	104	106	114	152
Sulfate et aération		296		56	
Accroissement p. 100		196		96	

— Dans tous les cas, les cellules observées dans les vins de *Grenache* sont d'une dimension inférieure à celle des cellules des vins de *Terret* (environ 3 à 4 μ contre 6 à 7 μ de diamètre). La forte concentration en sucre du moût en est-elle responsable ?

— Dans la série des *Terrets*, le témoin sans NH_4^+ révèle à côté des levures elliptiques, qui forment la très grande proportion de la population, l'existence de quelques levures apiculées en voie de dégradation (les levures sont granuleuses ou éclatées). Au contraire, dans tous les essais avec addition de NH_4^+, avec des proportions plus ou moins importantes selon l'anion du sel ajouté, la présence de levures apiculées est générale. Avec l'addition de sulfate et de tartrate d'ammonium, la proportion de levures apiculées est très élevée et arrive, dans certains cas, à 25 p. 100 environ. Comme le moût n'a pas été stérilisé au départ, malgré un ensemencement de *Saccharomyces ellipsoïdeus* de 1.10^6 germes au ml, on peut penser que la forte teneur en NH_4^+ ou l'acidité a favorisé le développement des levures apiculées qui se trouvaient initialement dans le moût.

B. — Influence des sels ammoniacaux sur certains caractères analytiques des vins

1° *Analyse sommaire*

L'analyse a été effectuée trois mois après la fin de la fermentation tumultueuse. Le tableau 2 donne les résultats obtenus :

L'addition d'un sel d'ammonium au jus de raisin avant la fermentation entraîne

au cours de celle-ci une élévation de l'acidité totale et une baisse du pH due à l'utilisation par la levure du cation ammonium, ceci est particulièrement net avec le sulfate. Dans les deux séries l'acidité volatile est plus faible dans les essais que dans les vins témoins.

2° *Les différents constituants azotés*

Dans une première série d'analyses on a déterminé sur le vin, l'azote ammoniacal et l'azote total, la différence donnant l'azote organique. Les mêmes déterminations avaient été faites sur le moût témoin. La composition des moûts des trois séries, T, P et S avait été ensuite établie par calcul.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3 :

Deux faits sont à retenir. tout d'abord, dans tous les cas, subsiste du NH_4^+ résiduaire, ce qui montre que 500 mg de N contiennent un excès apparemment inu-

TABLEAU 2

Analyse sommaire des vins (décembre 1962)

Essais	Acidités en SO_4H_2 g/l		pH	Alcool p. 100 en volume	Sucre (en glucose g/l)
	Totale	Volatile			
			Terret		
Moût	3,80		3,0		195,0
Vins					
Témoin	4,20	0,36	3,3	11°90	3,8
T 1	6,00	0,20	3,0	12°05	1,78
T 2	6,80	0,22	3,0	11°90	1,92
T 3	7,50	0,22	3,1	11°90	1,49
P 1	5,20	0,20	3,15	11°90	1,81
P 2	4,80	0,20	3,30	11°75	1,57
P 3	5,10	0,17	3,40	11°80	1,60
S 1	5,00	0,20	2,90	11°95	1,54
S 2	5,10	0,22	2,90	12°05	1,67
S 3	5,20	0,20	2,80	11°80	1,88
S aéré	5,60	0,34	2,70	11°75	1,36
			Grenache		
Moût	2,30		3,60		350
Vins					
Témoin	3,20	0,69	3,75	14°82	88
T 1	4,20	0,51	3,40	14°05	93,7
T 2	4,50	0,53	3,50	13°96	97,0
P 1	3,80	0,51	3,70	15°88	70,8
P 2	3,85	0,50	4,0	16°26	63,8
S 1	3,65	0,52	3,30	14°02	97,2
S 2	3,60	0,53	3,35	14°06	97,9
S aéré	3,60	0,56	3,20	14°12	86,8

TABLEAU 3

Composition des vins en azote (N en mg/l)

Essais	*Terret*			*Grenache*		
	N total	NH_4	N organique	N total	HN_4	N organique
Témoin	91	0	91	99	0	99
T 1.....	364	123	241	277	68	209
T 2.....	574	311	263	482	280	202
T 3.....	798	507	291			
P 1.....	425	182	243	365	136	229
P 2.....	658	386	272	600	366	234
P 3.....	833	588	245			
S 1	406	185	221	371	170	201
S 2	665	409	256	634	420	214
S 3	924	655	269			
S 3 aéré	623	338	284	353	154	199

tilisé par la levure. Ensuite, et ceci est plus important, il semble qu'au-delà d'une certaine dose exogène de NH_4^+, la quantité transformée en N organique se limite aux environs de 250 mg/l quelle que soit la dose de NH_4^+ initialement ajoutée ; ceci évidemment pour les conditions expérimentales réalisées dans ces essais.

TABLEAU 4

Composition en acides aminés dans les vins de Terret-Bourret

Acides a minés en mg/litre	Moût	Témoin	T 1	T 2	T 3	P 1	P 2	P 3	S 1	S 2	S 3	S aéré
Alanine	31	3,8	71	83	98	77	79	95	78	79	97	111
Arginine	114	2,3	21,8	26,5	29	18,5	19,6	19	32,2	35	38	39
Acide aspartique	7,6	4	67	73	83	75	80	87	65	69	75	72
Acide glutamique	60	21	100	93	69	93	59	81	93	95	106	108
Cystine	0,8	3	6,8	8,6	8	7,3	6,6	7,5	11,8	14,9	15,3	19,6
Glycocolle	7,1	10 4	53	57	67	53	60	70	58	58	58	60
Histidine	12,8	2,5	25	30	30	12	11,5	33	27	29	29	30
Isoleucine	8,8	5,4	59	66	71	49,5	65	65	62	62	60	66
Leucine	14	8,1	72	72	74	61	68	74	66	68	66	80
Lysine	4,4	4,7	74	85	89	65	78	83	72	69	72	85
Méthionine	0,7	1,5	9	11,2	11,6	9,4	11,8	10,8	9,9	9,8	7,7	12,2
Phénylalanine..	28	4,3	102	106	133	88,5	99	112	102	114	117	122
Proline	216	180	275,5	270	280	299	294	289	295	291	304	270
Sérine	43	33	122	165	160	103	107	110	107	110	127	122
Thréonine	31,6	2,3	41	45	47	39	44,5	47	38	38	37	42
Tyrosine.....	7,5	4,3	43	50	52	50	52	31	48	48	43	53
Tryptophane ..	3,9	2,5	10,5	12,7	10,6	14,4	14,1	16,1	12,8	13,2	11	11,3
Valine	17	4,8	55	64	66	53	55	57	59	58	57	70
N total en mg/l	98,6	37,3	155,7	171,4	180,7	147,9	154,1	168,7	161,9	164,9	171,6	180,8

TABLEAU 5

Composition en acides aminés dans les vins de Grenache

Acides aminés en mg/litre	Témoin	T 1	T 2	P 1	P 2	S 1	S 2	S aéré
Alanine	21,3	106	120	128	142	100	108	124
Arginine	2	33	33	37	37	38 8	38 4	35
Acide aspartique	8,5	52	50	74	79	50	54	49
Acide glutamique	16	81	87	92	101	81	78	83
Cystine	1,5	6,9	6,1	7	9,5	6,9	7,2	6,5
Glycocolle	5,8	40	41	44	47	36	38	35
Histidine	1,4	16	14,8	17,5	19	17	19	16
Isoleucine	6	36	35	28	41	35	34	35
Leucine	7,4	46	46	52	49	46	49	47
Lysine	5,7	78	73	76	81	76	76	66
Méthionine	0,6	8	7,5	7,3	6,8	8	7,5	5
Phénylalanine	7,9	58	48	66	70	80	76	55
Proline	114	189	194	205	201	184	184	188
Sérine	27	101	97	96	93	96	94	93
Thréonine	2,6	19,5	21,5	24	25,5	19	19,5	20
Tyrosine	4,2	30	28	31	32	26	30	25
Tryptophane	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Valine	4,9	41	41	46	47	36	36	37
N total en mg/l	29,9	123,9	128,8	140	146,7	128,6	130,8	125,8

Dans une deuxième série d'analyses on a exclusivement déterminé les acides aminés par voie microbiologique à l'aide des méthodes déjà décrites dans le travail précédent.

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 4 (*Terret*) et 5 (*Grenache*).

L'arginine exceptée, l'accroissement des doses des différentes acides aminés est remarquable. toutefois on ne peut établir une proportionnalité entre les doses initiales de NH_4^+ exogène et les quantités d'acides aminés finalement dosés.

Remarquons bien que l'ion PO_4^{---} ne se distingue pas des autres essayés quant à la production des acides aminés.

3° *Dégustation des vins*

On a dit plus haut que ces vins ayant reçu une affusion excessive de NH_4^+ n'étaient pas commercialisables. Cet excès de NH_4^+ marquerait-il la dégustation au point de les rendre désagréables et les vins imbuvables ?

Or, d'une façon très générale, les vins sont bons et les vins les plus riches en NH_4^+ sont encore convenables, l'ion NH_4 n'est pas perceptible.

D'une façon détaillée, les observations suivantes sont faites :

— Les vins de *Terret-Bourret* ont une apparence normale. Ils ont une bonne couleur jaune pâle, mais le témoin paraît avoir une nuance plus foncée que celle des vins ayant reçu l'anion tartrique. A ce point de vue il apparaît même que la série tartrique est plus claire que toutes les autres séries.

Tous ces vins sont très légèrement flous.

Dans la série T le T 2 paraît le plus limpide, le T 1 est le meilleur. Le T 3 présente une dureté trop sensible qui le rend le moins bon des trois.

Dans la série P, les vins se remarquent par une souplesse agréable, avec un goût bien particulier rappelant la réglisse. Ils sont différents de la série T, préférés par certains aux vins témoins.

Dans la série S, les vins ont une dureté excessive, qui les classe au-dessous des deux autres séries.

— Les vins de *Grenache* ont, d'une façon très générale l'apparence et la saveur des vins doux naturels qui, en l'espèce, sont des vins naturellement doux.

Ces vins ont une couleur rancio, plus accentuée dans le témoin. Dans les autres séries cette couleur est atténuée dans la série T et la série S aéré. Il y a là une constatation fort curieuse qui sera discutée au paragraphe « discussions ».

Dans la série T, le meilleur paraît être le T 1.

Dans la série S, le meilleur serait le S 2 et dans la série P, tous sont préférés à tous les autres, sauf pour les dégustateurs qui apprécient tout particulièrement la « douceur ». Dans cette série le meilleur serait le P 1. Cette série a les vins les plus fermentés.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

On va examiner successivement :

1° La composition analytique des vins.

2° L'évolution des différentes formes de N au cours de la transformation du moût en vin.

3° L'influence des doses exogènes de NH_4^+ sur la composition des vins en acides aminés.

4° Multiplication cellulaire et courbe de fermentation.

5° Les enseignements donnés par la dégustation.

I.— La composition analytique des vins

Les variations d'acidité ont été expliquées plus haut.

Les doses respectives d'alcool et de sucre n'appellent aucune observation particulière pour les vins de *Terret-Bourret*. Mais les vins de *Grenache* démontreraient une influence bénéfique de l'anion PO_4^{---} en présence de doses élevées de sucre. Indiscutablement, à ces doses, cet ion, paraît favoriser le phénomène fermentatif. Ceci sera examiné au paragraphe : « multiplication cellulaire et courbe de fermentation ».

II. — Évolution des différentes formes d'azote au cours de la transformation du mout en vin

Pour tous les essais on constate une diminution d'azote total et ammoniacal après fermentation, conséquence du métabolisme de la levure.

Pour l'essai témoin sans NH_4^+ ,on observe une consommation d'azote portant à la fois sur l'azote ammoniacal et surtout sur l'azote organique.

Au contraire, pour tous les essais enrichis en ammonium, on constate, qu'au lieu d'avoir diminué, l'azote organique a augmenté lors du passage du moût au vin ; tout se passant comme si la levure avait restitué (par excrétion ou synthèse dans le milieu) de l'azote sous forme organique. L'intensité de ce phénomène est dans cette expérimentation, telle que, dans tous les cas, les quantités d'azote organique trouvées dans les vins des différents essais sont toujours supérieures à la quantité d'azote organique présente initialement dans le moût.

Ce phénomène d'excrétion signalé par PEYNAUD-LAFOURCADE (1962), se retrouve ici dans tous les cas d'addition de NH_4 avec une généralité remarquable, et rend bien compte du phénomène de protéogenèse.

(L'action de l'autolyse propre des levures à laquelle on pourrait penser est très fortement limitée ici, par le fait que les lies ont été séparées du milieu après 10 jours de fermentation. Ce phénomène fera l'objet de résultats ultérieurs, mais l'on peut avancer déjà que son intensité, sans être absolument négligeable au bout de 10 jours, est très faible et hors de proportion avec les phénomènes de protéogenèse observés).

D'autre part, par différence entre l'azote organique total et l'azote des acides aminés, dosés par microbiologie, on obtient une valeur dénommée « Protéines ». (Ces protéines comprennent en réalité les protéines proprement dites, les amides et certains polypeptides).

TABLEAU 6

Composition de l'N organique dans le vin de Terret-Bourret
(*N en mg/l*)

Essais	Millions de levures	N organique total du vin	N aminé total dosé par microbiologie	p. 100 d'acides aminés dans l'augmentation de l'N org.	Protéines et amides totales
Témoin	100	91	97	—	54
T 1	162	241	155,7	79,1	85,3
T 2	187	263	171	77,9	92
T 3	192	291	180	71,5	91
P 1	136	243	147,9	60,8	95
P 2	151	272	154	63,9	118
P 3	165	245	168,7	85,5	76
S 1	175	221	161,9	96,07	59,1
S 2	204	256	165	77,5	91
S 3	206	269	171,6	75,6	97,4
S aéré	296	284	180,8	74,4	103,2

Ces résultats constituent le tableau 6.

On voit que les teneurs en *protéines* comme les teneurs en *acides aminés* vont en croissant comme le NH_4^+ exogène et le nombre de levures.

Dans une colonne ont été calculés les pourcentages d'acides aminés dosés par microbiologie par rapport à l'augmentation de l'N organique du vin dosé chimiquement. Ce pourcentage permet de se rendre compte que l'augmentation de N organique est constituée en général pour plus de 3/4 par des acides aminés.

TABLEAU 6 *bis*

Composition de l'N organique dans le vin de Grenache
(*N en mg/l*)

Essais	Millions de levures	N organique total du vin	N aminé total dosé par microbiologie	p. 100 d'acides aminés dans l'augmentation de l'N org.	Protéines et amides totales
Témoin	28,5	99	29,9	—	69,1
T 1	49	209	123,9	85,4	85,1
T 2	49	202	128,8	96	73,2
P 1	46	229	140	84	89
P 2	49	234	146.7	85,5	87,3
S 1	61	201	128,6	96,7	72,4
S 2	62	214	130,8	87,7	83,2
S aéré	56	199	125,8	95,9	73,2

Le tableau 6 *bis* rassemble les mêmes données pour le *Grenache*. On peut remarquer que plus nettement encore le N organique est presque essentiellement composé par des acides aminés ou des polypeptides. En ce qui concerne les valeurs des matières protéiques, on peut remarquer qu'elles varient assez peu d'un essai au suivant, et même d'un cépage à un autre. Donc, au plus peut-on remarquer que l'augmentation du N protéique est plus élevé dans la série *Terret-Bourret* que dans la série *Grenache* et ceci pourrait être aussi mis en parallèle avec la population en levure.

III. — Influence des doses exogènes de NH_4^+ sur la composition des vins en acides aminés

a) *Augmentation des acides aminés pris individuellement*

Tous les acides aminés présents dans le témoin se retrouvent dans les essais à des doses élevées. Qualitativement nous n'avons relevé aucune modification.

En établissant le rapport $\frac{\text{N aminé des essais}}{\text{N aminé témoin}}$ on a obtenu le tableau 7.

On voit que l'apport de NH_4^+ permet de multiplier les teneurs en différents acides aminés de 5 à 30 fois selon les acides.

Ainsi, pour le *Terret-Bourret* on a le classement suivant :

— 15 à 30 fois la valeur du témoin : valine, tyrosine, isoleucine, histidine ;

— 5 à 10 fois la valeur du témoin : arginine, leucine, méthionine, glycocolle ;

— 0 à 5 fois la valeur du témoin : tryptophane, acide glutamique, sérine, cystine, proline.

Pour le *Grenache* on a le classement suivant :

— 15 à 30 fois : l'arginine ;

— 10 à 15 fois : lysine, méthionine, histidine ;

— 10 à 5 fois : phénylalanine, valine, thréonine, acide aspartique, tyrosine, leucine, glycocolle, isoleucine, acide glutamique ;

— 1 à 5 fois : alanine, cystine, sérine, proline, tryptophane.

Le taux de multiplication est plus élevé pour le *Terret-Bourret* que pour le *Grenache*, pour l'ensemble des acides aminés, sauf pour l'arginine, le glycocolle, la méthionine.

TABLEAU 7

$$\text{Rapport} : \frac{\text{Teneur en acides aminés de l'essai (E)}}{\text{Teneur en acides aminés du témoin (T)}}$$

	Terret				*Grenache*			
	T 1	P 1	S 1	S aéré	T 1	P 1	S 1	S aéré
Valine	11,4	11	13,2	14,5	8,3	9,3	7,3	7,5
Alanine	18,6	19,7	20,5	29,2	4,9	6,0	4,6	5,8
Arginine	9,4	8,0	14,0	16,9	16,0	18,0	19,0	17,0
Acide aspartique	16,7	18,0	16,0	18,0	6,0	8,0	5,7	5,7
Acide glutamique	4,7	4,4	4,4	5,1	5,0	5,7	5,0	5,1
Cystine	2,0	2,4	3,9	6,5	4,6	4,6	4,6	4,3
Glycocolle	5,0	5,0	5,5	5,7	6,9	7,5	6,2	6,0
Histidine	10,0	4,8	10,8	2,0	11,4	12,5	12,0	11,4
Isoleucine	10,9	9,1	11,4	12,2	6,0	4,6	5,8	5,8
Leucine	8,8	7,5	8,1	9,8	6,2	7,0	6,2	6,3
Lysine	15,7	13,8	15,3	18,0	13,6	13,3	13,3	11,5
Méthionine	6,0	6,2	6,6	8,1	13,3	12,1	13,3	8,0
Phénylalanine	23.0	10,5	23,0	28,0	7,3	8,3	10,0	6,9
Proline	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6	1,6
Sérine	3,6	3,1	3,2	3,6	3,7	3,5	3,5	3,4
Thréonine	17,0	16,0	16,0	18,0	7,5	9,2	7,3	7,6
Tyrosine	10,0	11,6	11,1	12,3	7,1	7,3	6,1	5,9
Tryptophane	4,2	5,7	5,1	4,5				

La proline, le tryptophane, la sérine, et l'histidine ont un taux d'augmentation relativement constant quelle que soit la nature du moût.

Quant aux acides aminés soufrés (cystine et méthionine) il est difficile d'avancer que leur production ait été favorisée par l'ion SO_4^{--}, sauf peut-être pour le *Terret-Bourret*.

Cette augmentation constitue, nous semble-t-il, un fait assez remarquable et dont l'importance en valeur absolue ne semble pas avoir été signalée dans la littérature, au moins à notre connaissance.

b) *Augmentation des acides aminés groupés par familles*

Si nous comparons les teneurs en acides aminés des essais avec NH_4^+ aux teneurs en acides aminés du moût, nous pouvons faire la remarque générale suivante : sauf l'arginine, tous les acides aminés dosés ont une teneur supérieure dans le vin enrichi en NH_4^+ à celle du moût. C'est la preuve évidente d'une protéogenèse très active induite par l'ion NH_4^+.

Cette protéogenèse peut s'effectuer par une synthèse pouvant avoir lieu soit à l'intérieur des cellules, ou soit à l'extérieur par excrétion d'enzymes (CÉZAIRE, 1958-

PEYNAUD, LAFOURCADE, 1962). Ces deux hypothèses sont parfaitement valables dans notre cas, quoique la première soit plus vraisemblable.

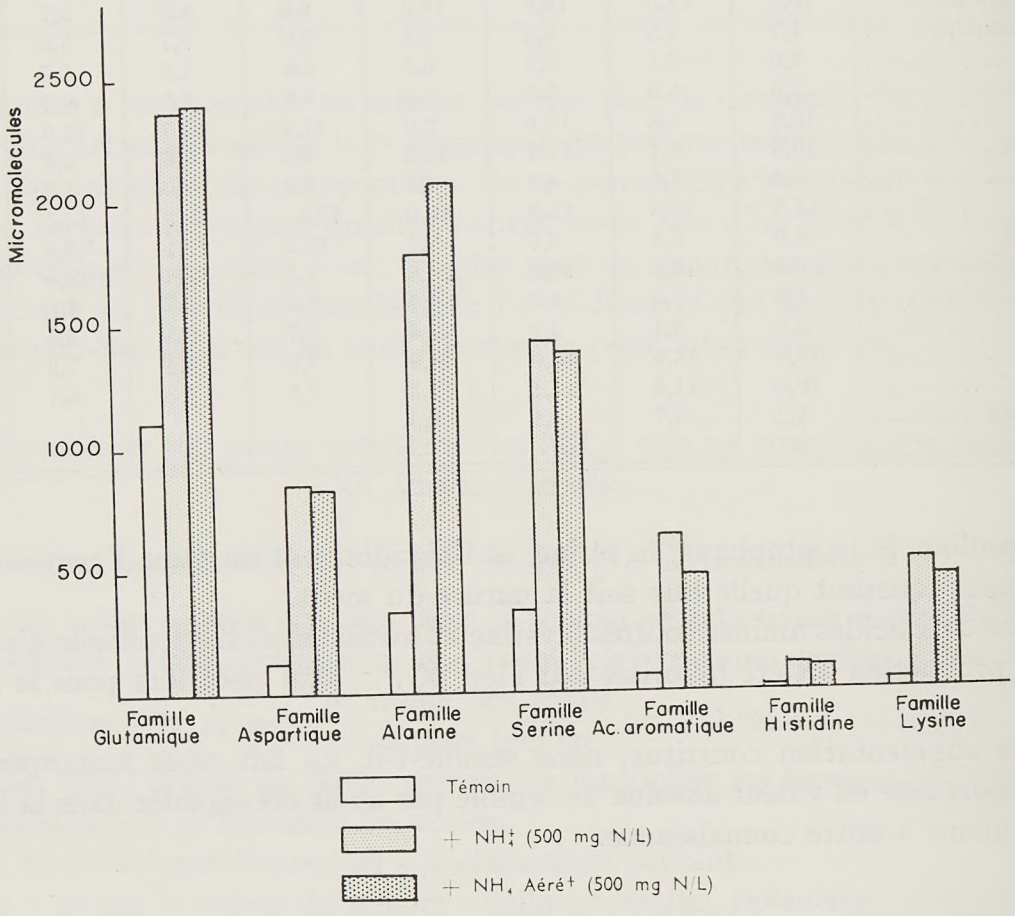
On sait que la fixation de $— NH_4$ sur une chaîne carbonée se fait par l'intermédiaire des acides cétoniques correspondants, soit par intégration directe, soit par la voie des transaminations. Ainsi ont été groupés par famille les acides aminés provenant des différents acides cétoniques. Selon G. HARRIS (1958), nous avons :

— le groupe de l'*acide glutamique* provenant de l'acide cétoglutarique comprenant : l'acide glutamique, l'arginine et la proline ;

— le groupe de l'*acide aspartique* provenant de l'acide oxalacétique comprenant : l'acide aspartique, la méthionine, la thréonine et l'isoleucine ;

— le groupe de l'*alanine* provenant de l'acide pyruvique comprenant : l'alanine, la valine et la leucine ;

— viennent ensuite les groupes de la sérine, de l'histidine, de la lysine et des acides aromatiques qui peuvent être rattachés aux groupes précédents par des voies de synthèse encore moins bien connues.



GRAPHIQUE 2. — *Grenache*

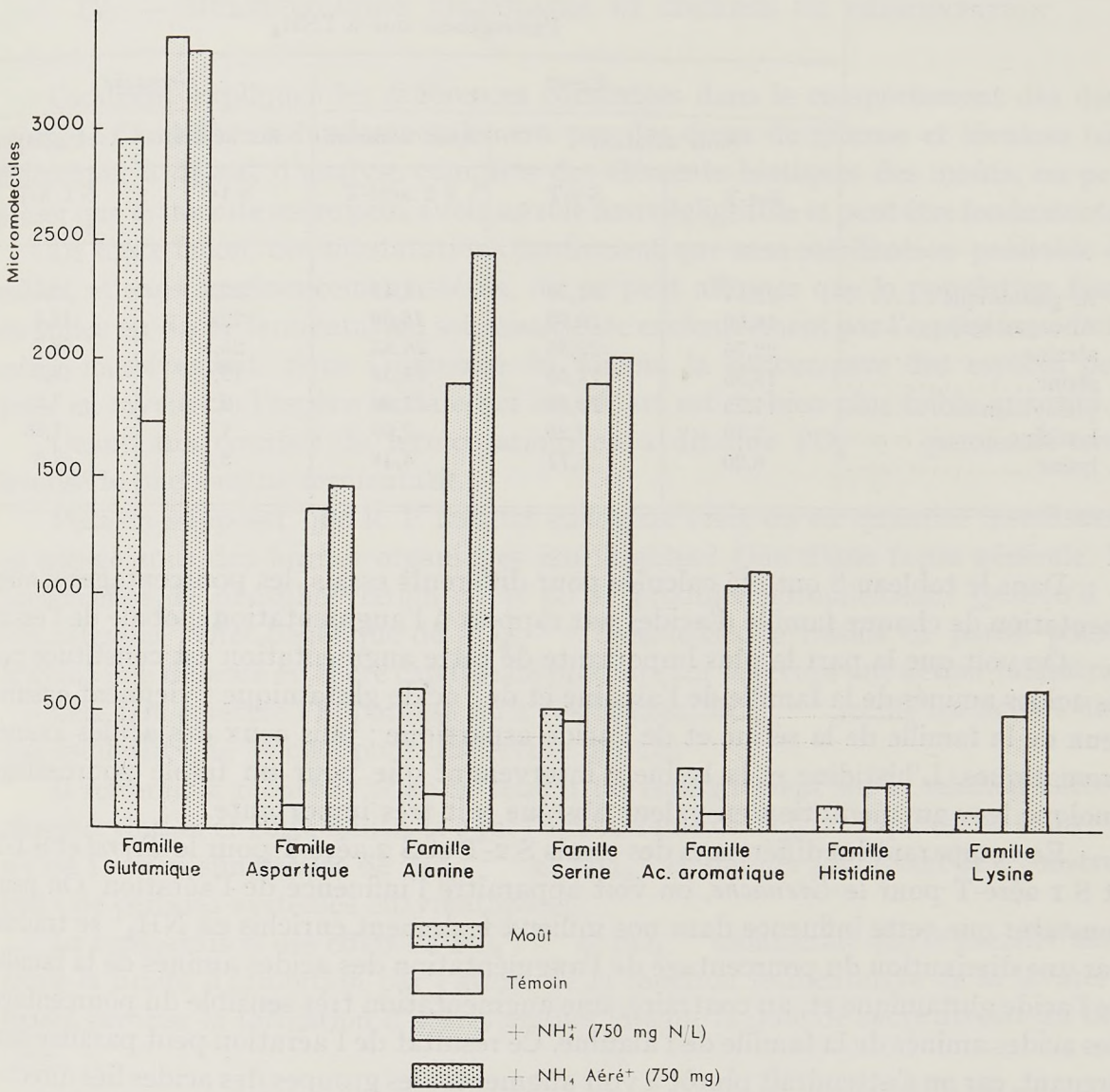
Il a paru intéressant de voir quelle était l'augmentation des acides aminés groupés par famille. Les résultats des dosages microbiologiques, calculés en micromolécules, ont été rassemblés dans le graphique 3 pour le *Terret-Bourret* 1962.

On observe que le vin témoin, correspondant à la fermentation du moût naturel non enrichi en NH_4^+, possède pour toutes les familles, sauf la lysine, des teneurs en acides aminés inférieures à celle du moût. Cette diminution donne la mesure de la participation de différents acides aminés à l'édification des protéines des levures.

qui se sont d'abord développées dans le milieu au cours de la fermentation, puis ont été éliminées du vin avec les lies.

Cela a été bien montré par tous les auteurs qui se sont occupés de l'alimentation azotée par les acides aminés.

Au contraire, les vins provenant du moût enrichi en NH_4^+, aéré ou non, voient leurs teneurs en acides aminés très fortement augmentées, montrant que ces ions NH_4^+ ont induit une amino-genèse remarquable, qui, en plus de la participation des acides aminés synthétisés, à l'édifice protidique des cellules, a laissé dans le milieu une fraction rtès importante de ces amino-acides.



GRAPHIQUE 3. — *Terret-Bourret*

Il en est de même pour le *Grenache*, graphique 4. A certains moments il semble que dans ces essais de 1962, l'aération a accentué l'effet de l'enrichissement en acides aminés.

En schématisant on peut dire que la protéogenèse a servi à synthétiser, d'une part, les acides aminés qui ont pu faire partie de l'édifice protéique de la levure, d'autre part la fraction des acides aminés restant dans les vins des différents essais enrichis.

Si l'on fait abstraction de la part des acides aminés qui ont dû rentrer dans *la constitution des cellules*, cette protéogenèse peut être en première approximation mesurée par la différence entre les valeurs des différents essais S 1, S 2, S 3 etc., par exemple, et la valeur du vin témoin T, soit S 1-T, S 2-T, etc.

TABLEAU 8

Pourcentage d'augmentation de chaque famille d'acides par rapport à l'augmentation globale de l'essai.
(Les calculs ont été effectués sur les teneurs en acides aminés exprimés en micromolécules)

	Protéogenèse due à NH_4				
	Terret			*Grenache*	
	Sans aération		Avec aération	Sans aération	Avec aération
	S 1-T	S 2-T	S 2 aéré-T	S 1-T	S 1 A-T
F. A. glutamique	22,14	*21,50*	*18,41*	22,3	22,7
F. A. aspartique	16,60	*16,60*	*16,00*	12,7	12,3
F. alanine	22,76	*22,86*	*26,83*	25,5	28,7
F. sérine	18,35	*18,50*	*18,39*	19,1	18,3
F. phénylalanine	11,75	*12,60*	*11,90*	9,8	7,05
F. histidine	2,10	*2,20*	*2,05*	1,7	1,66
F. lysine	6,20	*5,71*	*6,38*	8,5	7,3

Dans le tableau 8 ont été calculés pour différents essais, les pourcentages d'augmentation de chaque famille d'acides par rapport à l'augmentation globale de l'essai.

On voit que la part la plus importante de cette augmentation est constituée par les acides aminés de la famille de l'alanine et de l'acide glutamique ; viennent ensuite ceux de la famille de la sérine et de l'acide aspartique ; puis ceux des acides aminés aromatiques. L'histidine et la lysine n'intervenant que pour un faible pourcentage quoique leur augmentation en valeur absolue soit très importante.

En comparant les différences des essais S 2-T et S 2 aéré-T pour le *Terret* et S 1-T et S 1 aéré-T pour le *Grenache*, on voit apparaître l'influence de l'aération. On peut constater que cette influence dans nos milieux fortement enrichis en NH_4^+ se traduit par une diminution du pourcentage de l'augmentation des acides aminés de la famille de l'acide glutamique et, au contraire, une augmentation très sensible du pourcentage des acides aminés de la famille de l'alanine. Ce résultat de l'aération peut paraître surprenant, car on s'attendrait plutôt à voir augmenter les groupes des acides liés directement au cycle respiratoire, comme l'acide glutamique et l'acide aspartique. Toutefois, on peut supposer que l'aération (ayant eu lieu au début de la fermentation, durant 11 heures avec intermittences, pendant les deux premiers jours de la fermentation), a provoqué par la voie du cycle respiratoire une plus grande synthèse d'acide glutamique, lequel s'est ensuite transaminé avec l'acide pyruvique formé d'une façon continue durant toute la fermentation.

On remarque encore en comparant les doses globales d'acides aminés dans les vins de *Terret-Bourret* et de *Grenache*, que dans tous les cas la dose d'acides aminés est plus élevée dans le vin de *Terret-Bourret* que dans le *Grenache*.

Cette différence peut s'expliquer par la population de levures plus élevée dans le *Terret-Bourret*. Mais on peut encore penser que la qualité de cette population n'est pas indifférente à cette production. Dans ce dernier cas, il faudrait conclure que la capacité aminogène des apiculées est différente de celle des *Saccharomyces*. Quoiqu'il en soit, se pose une fois encore le problème de la hiérarchie des levures en fonction de leur puissance aminogène et non plus alcoogène.

IV. — Multiplication cellulaire et courbes de fermentation

Comment expliquer les différences constatées dans le comportement des deux cépages ? Ils diffèrent fondamentalement par des doses de glucose et lévulose bien différentes, à défaut d'analyse complète des éléments biotiques des moûts, on peut penser que le taux de sucre peut avoir un rôle non négligeable et peut être fondamental.

De toute façon, ces constatations confirment que sans stérilisation préalable du milieu, et sans ensemencement stérile, on ne peut affirmer que la population finale du milieu en fin de fermentation soit constituée exclusivement par l'espèce introduite, même massivement. Sous l'influence du milieu, la concurrence des espèces peut jouer en faveur de l'espèce initiale qui au départ est en bien plus faible quantité.

Quant aux courbes de fermentation, on a dit que PO_4^{---} paraissait avoir favorisé le phénomène fermentatif.

Peut-on supposer que le P naturel endogène était ou en quantité insuffisante, ou engagé sous des formes organiques inutilisables ? Que d'une façon générale, les phénomènes de phosphorylation n'ont pu se produire normalement ? Quoiqu'il en soit, retenons l'effet bénéfique de PO_4^{---} dans le cas de raisins en partie pourris et ayant une richesse en sucre capable de produire sur la levure une action inhibitrice.

Cela fait émettre l'hypothèse qu'a ces limites, PO_4^{---} recule les limites de la dose inhibitrice de l'alcool pour une levure définie.

Il resterait à montrer, pour en retenir un enseignement sur la relation entre la phosphorylation et cette limite, si c'est l'action seule de PO_4^{---} qui est en cause, ou si c'est l'action simultanée de PO_4^{---} et NH_4^{+}, ce dernier favorisant la « construction » de certains systèmes enzymatiques ?

La comparaison des effets de PO_4^{---} et SO_4^{--} montrerait que le premier anion recule la limite d'inhibition par l'alcool de la fonction fermentative de la levure, le second favorise la formation d'acides aminés lorsque la dose de sucre atteint un taux élevé.

V. — Dégustation

La dégustation appelle deux observations fondamentales en dehors de celles qui ont été faites au chapitre « Résultats ».

D'une part, *la coloration « réduite »* des vins additionnés de l'anion tartrique. A priori, on doit penser au dérivé réducteur de l'acide tartrique, tel que l'acide dihydrofumarique. Si ceci est confirmé par des expériences ultérieures, le métabolisme de l'acide tartrique doit être plus attentivement suivi qu'il ne l'a été jusqu'ici. Peut-

être l'acide tartrique apparaîtra-t-il alors comme un des éléments fondamentaux de l'évolution du vin, ce que certains auteurs pensent.

D'autre part, l'action de l'aération sur la coloration des vins de *Grenache* fortement colorés par suite de l'action oxydante de la polyphénoloxydase apportée par le *Botrytis cinerea*. On sait déjà que l'action préventive de SO_2 agit d'autant mieux qu'elle est suivie d'une aération.

Comme le SO_2 a été rigoureusement exclu, quelle que soit la phase d'élaboration et d'évolution du vin, on peut penser qu'en l'espèce l'O a été capté par un accepteur autre que le SO_2. Peut-être s'agit-il d'un dérivé de l'acide tartrique. Ceci appelle encore de nouvelles recherches.

Mais il importera corrélativement de connaître la quantité exacte de O_2 introduit dans le vin et d'y préciser son évolution.

CONCLUSION

Sur le plan biochimique

1° L'apport exogène de NH_4^+ permet d'enrichir la teneur en acides aminés des vins dans une proportion considérable et donne le moyen de faire varier dans une large mesure la composition des vins en acides aminés. Dans nos essais, nous observons un enrichissement arrivant jusqu'à multiplier par 4 les valeurs du vin témoin en acides aminés totaux (valeurs exprimées en mg de N).

2° Si l'on considère maintenant, non pas l'enrichissement global, mais l'enrichissement des différents acides aminés, pris individuellement, ou groupés par famille. on constate que cette augmentation ne s'effectue pas dans la même proportion, soit pour chacun des acides aminés soit par groupes d'acides aminés.

L'histidine et la lysine augmentent toujours fortement de 10 à 14 fois environ, quel que soit la composition du moût initial (*Terret* ou *Grenache*).

La famille des acides aminés aromatiques est celle qui est aussi toujours très fortement influencée par l'apport d'ions NH_4^+ (15 fois pour le *Terret* et 9 fois pour le *Grenache*).

Les familles de l'acide aspartique et de l'alanine viennent ensuite avec des coefficients d'augmentation respectifs de 13,4 et 12,9 pour le *Terret* et de 6,4 et 5,3 pour le *Grenache*.

La famille de l'acide glutamique est celle dont l'augmentation est la plus faible, coefficient de 1,96 pour le *Terret* et de 2,13 pour le *Grenache*.

Il est actuellement admis que le mécanisme de fixation de l'ammoniaque s'effectue principalement par la voie de la glutamico-déshydrogénase et aussi en deuxième lieu par la voie de l'aspartase (Harris, 1958).

Les résultats de ce travail ne permettent pas de fixer lequel des mécanismes est impliqué préférentiellement. Tout ce que l'on peut dire c'est que c'est finalement la famille de l'alanine, donc de l'acide pyruvique qui révèle la plus forte augmentation. Cela n'a rien pour étonner car dans ces essais, la formation d'acide pyruvique est con-

tinue tout le long de la fermentation, c'est donc l'acide cétonique, dont la présence constante dans le milieu permet soit par fixation directe de l'N, soit par la voie de transamination, la synthèse la plus élevée de l'acide aminé correspondant.

Sur le plan technologique

Une dose de NH_4^+ correspondant à 250 mg-300 mg N/l semble correspondre à la capacité aminogène des levures dans les conditions de nos essais. Il reste à connaître toutes les conséquences de cet enrichissement dont les premières paraissent être bénéfiques aussi bien sur la qualité gustative du vin que sur son comportement comme boisson.

— Les races de levures indigènes ayant agi dans ces essais ont produit un supplément de N organique correspondant à une dose initiale exogène de 250 à 300 mg de N/l ajouté sous forme de NH_4^+. Cet accroissement n'est pas le même pour tous les acides aminés et est extrêmement variable.

— Au-delà de cette dose, NH_4^+ est inutilisé, mais n'a pas atténué la valeur gustative des vins.

— Les anions tartrique^{--}, phosphorique^{---}, sulfurique^{--} combinés à l'ion NH_4^+ ont un comportement différent. PO_4^{---} reculerait la limite inhibitrice de l'alcool, SO_4^{--} favoriserait la production d'acides aminés lorsque la dose de sucres serait élevée et l'ion tartrique^{--} serait à l'origine de dérivés réducteurs améliorant la valeur gustative des vins.

Au cours du déroulement de ces travaux on a constaté que des mesures ont été omises.

En particulier, la détermination des doses de N éliminées avec les levures, la mesure des quantités d'oxygène absorbé au cours de l'aération. Elles auraient permis d'interpréter plus complètement les résultats obtenus.

Reçu pour publication en avril 1964.

SUMMARY

ALCOHOLIC YEASTS IN WINES PROTEOLYSIS AND PROTEOGENESIS

Additions of ammonium ions in the form of tartrate, phosphate, and sulphate to a grape-must, in such quantities that there remained an excess of NH_4^+ after fermentation, gave rise to the following statements :

— A part from the known increases in the yeast population and the rate of fermentation, this addition provokes remarkable aminogenesis. The amount of amino acids multiply in a variable fashion according to the acids, but are capable of attaining, on average, 15 to 20 times the value for the control wine.

— The mechanism of the fixation of NH_4^+ is discussed in relation to the fact that the amino acids of the alanine family show the strongest increase in this experiment.

The differences between the effects of the tartrate, phosphate, and sulphate ions were noted. They affect, in particular, the inhibitive action of alcohol and the production of the amino-acids.

Wine tasting demonstrates the beneficial action of certain anions, particularly tartrate and phosphate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cézaire O., Neuzil E., et Boiron H., 1958. Recherches sur le métabolisme azoté microbien. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1435-1452.

Flanzy M., de Sèze R., Lamazou-Betbeder Marie, 1936. Essais sur le mode d'action de certains produits œnologiques utilisés en vinification. *Rev. Vit.*, **84**, 5-25.

Flanzy M., de Sèze R., 1937. Action comparée des phosphates et des composés ammoniacaux sur la fermentation des moûts de raisin. *Rev. Vit.*, **86**, 389-393.

Harris G., 1958. Nitrogen Metabolism p. 437 in A. H. Cook : *The Chemistry and Biology of yeasts* Acad. Press. Inc. Publishers.

Peynaud E., Lafourcade S., 1962. Sur la nutrition azotée des levures de vin. *Rev. ferm. Ind. alim.*, **17**, 11-21.

Poux C., Flanzy C., et Flanzy M., 1963. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et Protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 5-18.

Ann. Technol. agric., 1962, **13** (3) 301-308.

ABSENCE D'ACIDE GLYCURONIQUE DANS LES VINS

Voula DIMOTAKI-KOURAKOU

Institut du Vin, Athènes (Grèce)

SOMMAIRE

L'acide glycuronique a été signalé dans les vins provenant de vendanges pourries, eudémisées ou moisies. L'auteur de ce mémoire avait déjà mis en doute sa présence, même dans les vins botrytisés. Poursuivant ses recherches, il a pu vérifier avec certitude que l'acide glycuronique n'existe pas dans les vins.

INTRODUCTION

Les travaux relatifs à la teneur des vins en acides uroniques sont peu nombreux et leurs résultats sont assez contradictoires.

CHOUCHAK (1928) a le premier signalé la présence de l'acide glycuronique dans les vendanges eudémisées, pourries, ou moisies. Onze années plus tard, VENTRE (1939) a pu le doser quantitativement selon la méthode à la naphtorésorcine.

Depuis lors on retrouve dans tous les ouvrages œnologiques la même doctrine : l'acide glycuronique existe dans les vins issus des vendanges botrytisées à des doses pouvant atteindre jusqu'à 1,25 g par litre. Les vendanges saines et les vins normaux sont pratiquement exempts de ce corps, il n'y en a jamais plus de 0,3 g par litre.

D'après RENTSCHLER et TANNER (1955), les vins normaux sont à peu près exempts d'acide glycuronique : la quantité ne dépasse pas 50-100 mg par litre, même dans les vins provenant des vendanges botrytisées. Tout au contraire, l'acide galacturonique semble exister dans tous les vins en quantité un peu plus élevée que celle de l'acide glycuronique.

En 1962 nous avons communiqué à la Sous-Commission de l'Office Internationale de la Vigne et du Vin les résultats d'un travail (GEORGEAKOPOULOS, DIMOTAKI-KOURAKOU et LYDAKI-KRIESI, 1962-1963), concernant la présence constante de l'acide galacturonique dans les vins et nous avons décrit une méthode simple pour

évaluer la teneur des vins en cet acide. Ce travail nous a permis de constater que l'acide galacturonique provoque une erreur importante dans le dosage des sucres des vins secs, étant donné que la teneur des vins rouges en cet acide atteint et quelquefois dépasse la dose d'un gramme par litre ; Celle des vins blancs, issus des vendanges saines oscille de 0,2 à 0,4 g/l et celle des moûts ne dépasse pas 0,2 g/l. Cela nous fait conclure que l'acide galacturonique provient de la pectine à la suite d'une hydrolyse enzymatique, qui a lieu au cours de la fermentation alcoolique. Les vins rouges sont plus riches que les vins blancs du fait que la pectine est un constituant des pellicules plutôt que du jus.

L'utilisation de la chromatographie sur papier nous a également permis de constater que les moûts et les vins normaux sont exempts d'acide glycuronique et de mettre en doute sa présence même dans les vendanges botrytisées. D'après nos chromatogrammes et l'emploi des réactions spécifiques sur papier, seul l'acide galacturonique existe en quantités relativement importantes dans les moûts et les vins provenant de telles vendanges. Cela s'explique du fait que *Botrytis cinerea* est riche en enzymes hydrolytiques parmi lesquelles se trouvent classées la pectinase et la pectase.

Blouin et Peynaud (1963) ont repris notre travail et une année plus tard ont publié leurs résultats sur la présence constante des acides uroniques dans les vins.

« La présence constante d'acides uroniques dans les moûts de raisins et les vins à des doses de 200 à 1 000 mg/l contribue à expliquer les écarts de dosage des sucres réducteurs selon le procédé de défécation. »

C'est ainsi que Blouin et Peynaud ont confirmé une partie de notre travail, car comme ils n'ont pas pu réaliser une séparation des deux acides et comme ils ont employé pour la révélation du chromatogramme des réactions peu caractéristiques (taches brunes rougeâtres pour l'acide glycuronique et brunes jaunâtres pour l'acide galacturonique), ils ont cru constater « par la hauteur et la coloration des taches, la présence simultanée des deux acides à des doses approximativement du même ordre de grandeur ».

En poursuivant notre travail nous avons pu vérifier avec certitude que l'acide glycuronique n'existe pas dans les vins et nous allons relater l'essentiel de nos recherches.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Identification de l'acide glycuronique

Certes, la différence des Rf des acides galacturonique et glycuronique, soumis à l'analyse chromatographique sur papier selon les méthodes décrites jusqu'à présent, est si faible qu'on ne peut pas différencier ces deux acides en se basant exclusivement sur les valeurs des Rf et la hauteur des taches.

C'est pourquoi nous avons employé pour la révélation des chromatogrammes une réaction spécifique à base d'acétate de plomb pour mettre en évidence la présence de l'acide galacturonique (taches de couleur rouge brique, l'acide glycuronique ne réagit pas). Cette réaction avait été décrite dans une publication précédente (Georgeakopoulos, Dimotaki-Kourakou et Lydaki-Kriesi, 1962-1963).

Après avoir essayé en vain de trouver une réaction spécifique pour l'acide glycuronique, nous avons décidé de transformer cet acide en un produit dont le Rf diffère nettement du Rf de l'acide galacturonique. Dans ce but nous avons fait appel à la propriété de l'acide glycuronique de se transformer partiellement en glycuronolactone, dont le Rf est deux fois et demie plus grand que le Rf de l'acide glycuronique lui-même (Partridge, 1948). Cette lactonisation partielle a lieu lorsqu'on chauffe la solution de l'acide glycuronique légèrement acidifiée sur un bain-marie bouillant. Dans ces conditions l'acide galacturonique ne se lactonise pas.

Mode opératoire : On fait passer 25 ml de l'échantillon à analyser à travers une colonne d'échangeur d'anions Dowex 1 × 2 (20 ml, 50-100 mesh) sous forme acétate à raison de 3 ml toutes les deux minutes. On lave la colonne avec 100 ml d'eau distillée et on procède à l'élution des acides fixés sur la résine avec 200 ml d'une solution 2N d'acide acétique. Après concentration sur un bain-marie bouillant jusqu'à siccité, le résidu repris par 2 ml d'eau est soumis à l'analyse chromatographique (FISCHER et DÖRFEL, 1955, GEE, Mc CREADY, 1957, GEORGEAKCIOULOS et *al.*, 1962-1963).

— Papier : Whatman n° 1.

— Chromatographie ascendante.

— Solvant : Éther acétique, pyridine, eau, acide acétique (5 : 5 : 3 : 1).

— Volume des solutions employées comme témoin : 100 microlitres des solutions, contenant plus de 4 g/l de l'acide galacturonique et glycuronique.

— Durée du développement : 15 à 18 heures.

Le chromatogramme reste ensuite pendant 5 heures à une température de 25° C sous un léger courant d'air pour que l'élimination de l'acide acétique soit aussi complète que possible. Au bout de ce temps on procède à la révélation du chromatogramme en employant l'un des deux réactifs décrits ci-dessous.

Réactif n° 1 : On trempe le chromatogramme dans une solution de 2 g d'aniline et 2 g d'acide trichloracétique cristallisé dans 100 ml d'éther acétique. On le laisse à la température ordinaire durant un quart d'heure et ensuite à la température de 95°C pendant cinq minutes. *Les acides uroniques aussi bien que la glycuronolactone donnent des taches brun foncé sur fond blanc à partir de* 10 γ.

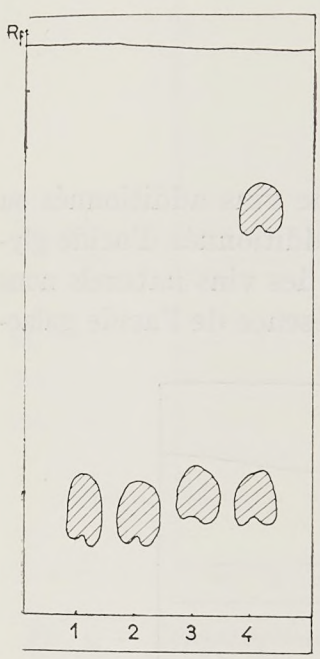


FIG. 1

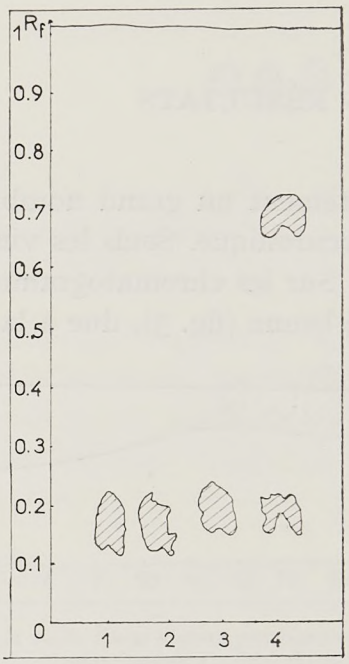


FIG. 2

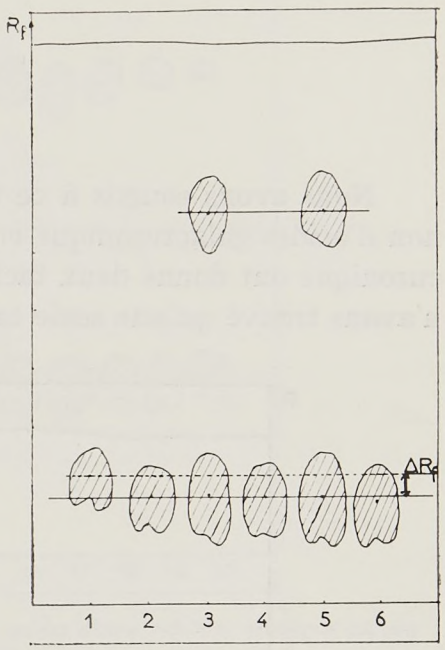


FIG. 3

FIG. 1. — *Chromatogramme pour l'identification de l'acide glycuronique*
De gauche à droite : 1) Solution pure d'acide galacturonique. 2) Solution analogue au vin, additionnée d'acide galacturonique et soumise au traitement décrit dans notre texte. 3) Solution pure d'acide glycuronique. 4) Solution analogue au vin additionnée d'acide glycuronique et soumise au traitement décrit. On voit bien la deuxième tache qui témoigne la transformation partielle de l'acide glycuronique en glycuronolactone.

FIG. 2. — *Chromatogramme pour l'identification de la glycuronolactone*
De gauche à droite : 1) Solution pure d'acide galacturonique. 2) Solution de composition analogue au vin additionnée d'acide galacturonique et soumise au traitement décrit dans notre texte. 3) Solution pure d'acide glycuronique. 4) Solution analogue au vin additionnée d'acide glycuronique et soumise au traitement décrit. On ne voit qu'une tache violette à Rf 0,7 : celle de la glycuronolactone. Les acides uroniques ne donnent aucune tache pendant les premières heures. Ce n'est qu'après quelques jours qu'apparaissent les quatre taches à Rf 0,22-0,27, qui restent jaune-brun tandis que le fond passe de jaune-brun au vert olive.

FIG. 3. — *Chromatogramme pour l'identification de l'acide glycuronique*
De gauche à droite : 1) Solution pure d'acide additionné d'acideg lycuronique. 2) Solution pure d'acide galacturonique. 3) Vin blanc additionné d'acide glycuronique 4) Vin blanc additionné d'acide galacturonique. 5) Vin blanc additionné de ces deux acides. 6) Vin de Sauternes. On ne retrouve la tache de la glycuronolactone que dans le cas des vins additionnés d'acide glycuronique. Les vins normaux ne donnent qu'une seule tache brune ; celle de l'acide galacturonique.

Réactif n° 2 : On pulvérise le chromatogramme avec une solution alcaline d'hydroxylamine fraîchement préparée (7 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 100 ml d'alcool méthylique + 7,2 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml d'alcool méthylique) et on le laisse à la température ordinaire durant un quart d'heure. Au bout de ce temps on le pulvérise de nouveau avec une solution de fer trivalent (1 g de chlorure ferrique dans 100 ml d'une solution à 1 p. 100 d'acide chlorhydrique). *La présence de glycuronolactone est marquée à partir de 10 γ par une tache d'une couleur violette avec quelques zones orangées sur fond jaune-brun. Les acides uroniques ne réagissent pas* tout d'abord. Après *plusieurs jours* le fond devient vert, la tache de la glycuronolactone devient entièrement violette, tandis que les taches d'acides uroniques apparaissent en jaune-brun à Rf 0,22-0,27.

Les chromatogrammes des figures 1 et 2 sont à la base exactement les mêmes. Leur différence apparente n'est due qu'au réactif de la révélation.

D'après le chromatogramme de la figure 1, (réactif révélateur n° 1) la solution d'acide galacturonique traitée ou non selon la technique susmentionnée donne une seule tache brune d'un Rf déterminé (Rf 0,22), tandis que la solution traitée de l'acide glycuronique donne deux taches brunes dont l'une correspond à l'acide glycuronique (Rf 0,27). La valeur du Rf de la seconde tache oscille entre 0,70 et 0,80. Cette tache est due à la présence de glycuronolactone formée par lactonisation partielle de l'acide glycuronique.

Sur le chromatogramme de la figure 2 (réactif révélateur n° 2) on ne voit qu'une seule tache de couleur violet-orangé, celle de la glycuronolactone. Les acides uroniques ne réagissent pas pendant les premières heures.

C'est ainsi que nous avons pu montrer que seul l'acide glycuronique se lactonise dans les conditions décrites.

RÉSULTATS

Nous avons soumis à ce traitement un grand nombre de vins additionnés ou non d'acides galacturonique et glycuronique. Seuls les vins additionnés d'acide glycuronique ont donné deux taches. Sur les chromatogrammes des vins naturels nous n'avons trouvé qu'une seule tache brune (fig. 3), due à la présence de l'acide galac-

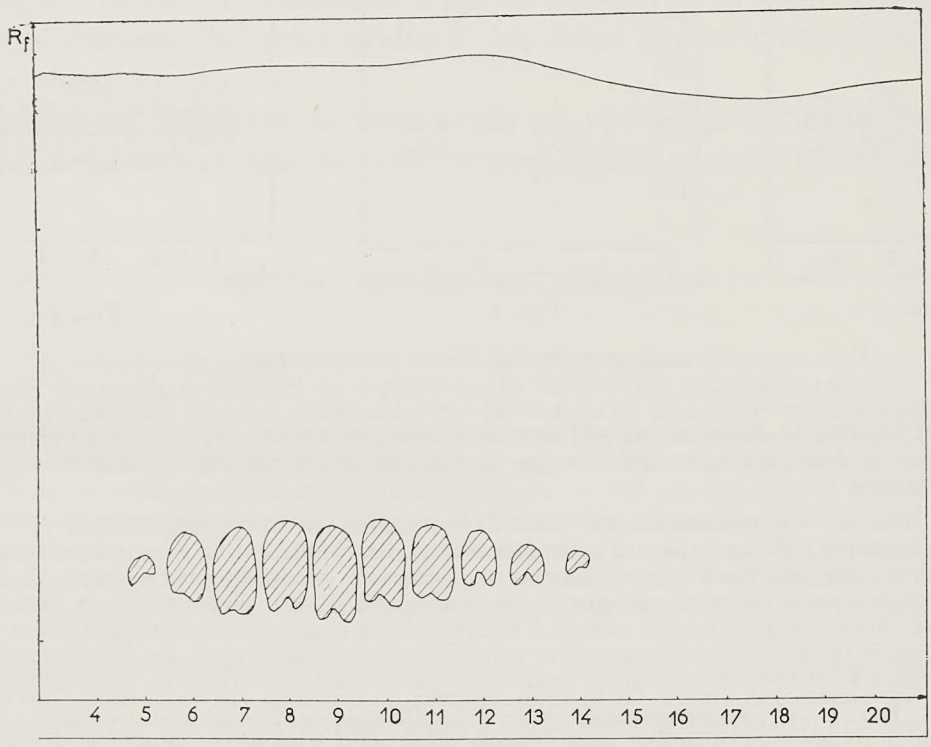


FIG. 4. — *Chromatogramme à la suite d'une élution fractionnée des acides d'une solution de composition analogue à celle du vin additionnée d'acide galacturonique.*
On voit bien que le maximum de l'élution de cet acide se place entre la 7e et la 9e fraction. La 14e fraction ne contient que des traces d'acide galacturonique.

turonique, ainsi que nous avons pu le vérifier à l'aide d'une réaction spécifique décrite dans une publication précédente. D'ailleurs en employant la réaction spécifique pour l'identification de la glycuronolactone, nous n'avons dans aucun cas pu déceler la présence de ce corps dans les vins naturels soumis au traitement susmentionné. Cela signifie que l'acide glycuronique n'existe pas dans les vins.

Séparations des acides uroniques

Nous avons également essayé de réaliser une séparation des acides galacturonique et l'acide glycuronique dans le but de confirmer les conclusions que le travail relaté ci-dessus nous permet de tirer.

C'est pourquoi nous avons procédé à une élution fractionnée des acides, fixés

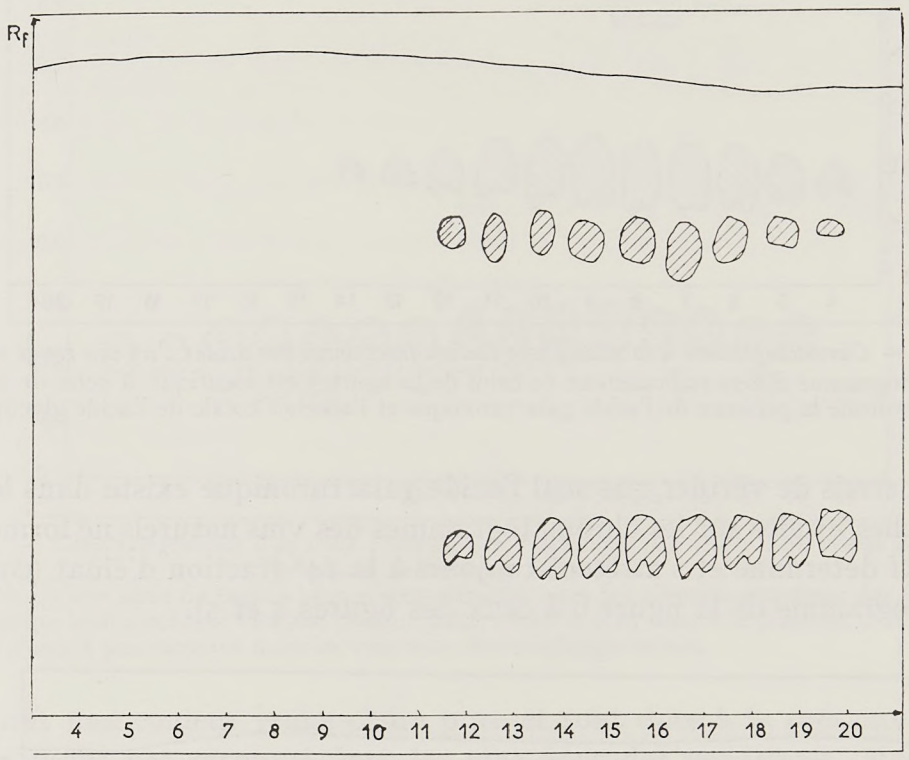


FIG. 5. — *Chromatogramme à la suite d'une élution fractionnée des acides d'une solution analogue au vin additionnée d'acide glycuronique*

On voit bien deux séries de taches brunes (acide glycuronique et glycuronolactone) qui commencent à partir de la 12e fraction.

sur la résine Dowex 1 × 2, à l'aide de 500 ml d'une solution 0,5 N d'acide acétique. Les vingt fractions d'éluat d'un volume de 25 ml chacune sont concentrées sur un bain-marie bouillant jusqu'à siccité. Le résidu repris par 1 ml d'eau est soumis à l'analyse chromatographique selon la méthode décrite ci-dessus.

En traitant ainsi 25 ml d'une solution ayant une composition analogue à celle du vin, additionnée soit d'acide galacturonique, soit d'acide glycuronique (1 g par litre), nous avons pu constater que l'acide galacturonique passe dans les premiers 350 ml d'éluat et que le maximum de son élution se place entre la 6e et la 10e fraction (fig. 4), tandis que l'acide glycuronique ne commence à paraître dans l'éluat qu'à partir de la 12e fraction, c'est-à-dire après le passage des 300 premiers ml d'éluat. Son maximum se place entre la 15e et la 17e fraction. On voit bien sur le chromato-

gramme de la figure 5 les deux séries de taches brunes qui correspondent à l'acide glycuronique et à sa lactone.

Ainsi nous avons pu réaliser une assez bonne séparation de deux acides, fait

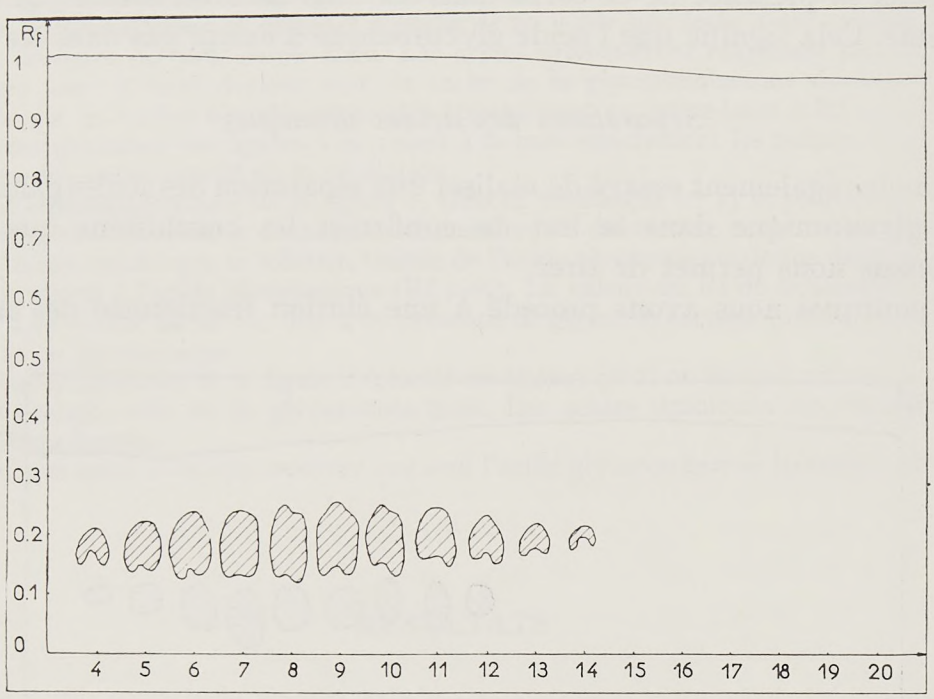


FIG. 6. — *Chromatogramme à la suite d'une élution fractionnée des acides d'un vin rouge naturel*
Ce chromatogramme diffère radicalement de celui de la figure 5 est identique à celui de la figure 4, fait qui confirme la présence de l'acide galacturonique et l'absence totale de l'acide glycuronique.

qui nous a permis de vérifier que seul l'acide galacturonique existe dans les vins. En effet, les taches brunes sur les chromatogrammes des vins naturels ne forment qu'une série d'un Rf déterminé et s'arrêtent toujours à la 14e fraction d'éluat (comparaison du chromatogramme de la figure 6 à ceux des figures 4 et 5).

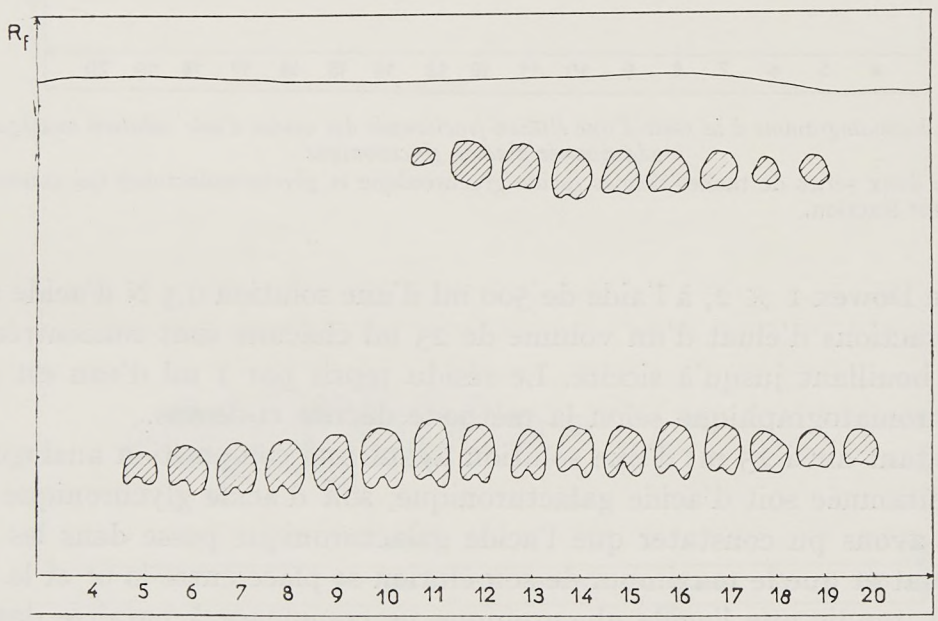


FIG. 6 *bis*. — *Chromatogramme à la suite d'une élution fractionnée des acides d'un vin rouge naturel additionné d'acide glycuronique*
(à comparer au chromatogramme de la fig. 6)

Le même vin, additionné d'un gramme d'acide glycuronique, a donné le chromatogramme n° 6 *bis*, sur lequel on voit les taches de l'acide glycuronique et de sa lactone qui n'existent pas sur le chromatogramme n° 6 obtenu avec le vin naturel sans addition.

Nous avons également appliqué l'élution fractionnée à un vin de Sauternes *(Château de Rayne — Vigneau* 1954). Sur le chromatogramme de la figure 7 on ne voit qu'une série de taches brunes qui s'arrêtent à la 14e fraction. Les taches qui leur

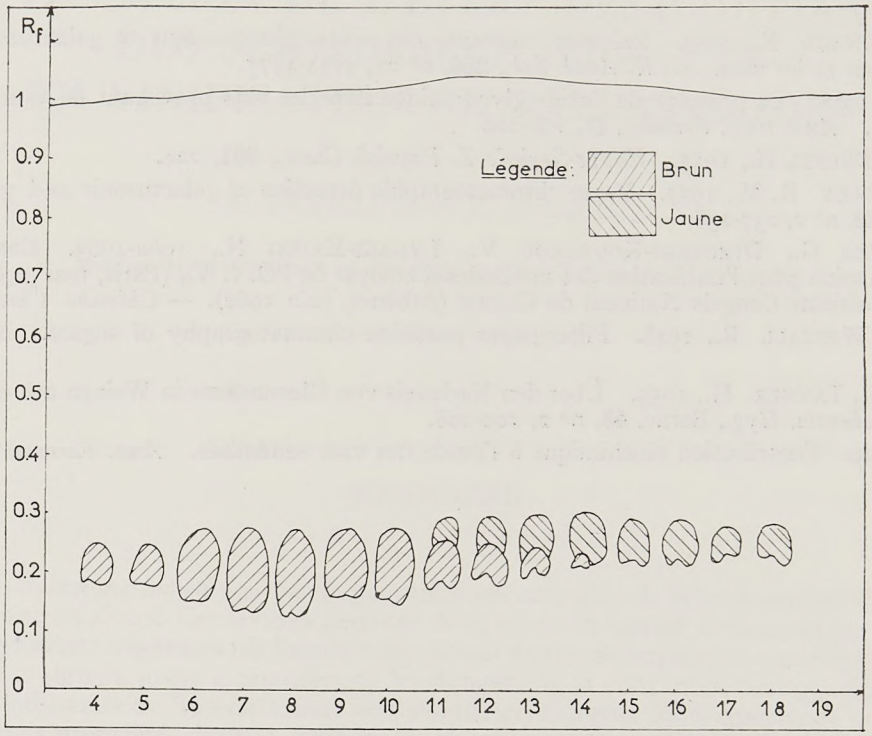


FIG. 7. — *Chromatogramme à la suite d'une élution fractionnée des acides d'un vin de Sauternes provenant de vendange botrytidsée*
On ne voit qu'une série de taches brunes (comparaison avec les chromatogrammes des figures 4 et 6). Les taches qui leur succèdent ont une couleur jaune claire et sont dues à la présence d'un acide inconnu que nous n'avons pas retrouvé dans les vins issus des vendanges saines.

succèdent ont une couleur jaune claire pure et sont dues à la présence d'un acide que nous n'avons pas retrouvé dans les vins issus des vendanges saines. Il s'agit d'un acide inconnu, étant donné que l'acide gluconique qui existe dans des vendanges botrytisées ne donne pas cette réaction.

Ainsi les résultats du travail que nous venons de relater confirment ceux de notre publication précédente (1962-1963), et nous permettent de soutenir avec assurance que l'acide galacturonique est le seul acide uronique qui existe dans les vins. Les vins normaux aussi bien que les vins issus des vendanges botrytisées sont exempts de l'acide glycuronique.

Reçu pour publication en février 1964.

SUMMARY

GLYCURONIC ACID IN WINE

The difference in Rf between galacturonic and glycuronic acids submitted to paper chromatography was too slight to enable them to be distinguished from each other with certitude. Lactoniza tion, however, partly transformed glycuronic acid into glycuronolactone, whereas galacturonic acid remained unchanged, and the Rf of the former was twice that of glycuronic acid itself.

This treatment had been used with a large number of wines, both with and without additions of galacturonic and glycuronic acids. Results showed that galacturonic was the only urinic acid present in wine. Normal wines as well as those made from *Botrytis* infected grape did not contain glycuronic acid.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Blouin J., Peynaud E., 1963. Présence constante des acides glucuronique et galacturonique dans les moûts de raisins et les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, n° 22, 4774-4775.

Chouchak D., 1928. La présence de l'acide glycuronique dans les vins provenant de vendanges pourries ou eudémisées. *Ann. Fals. Fraudes*, **21**, 198-200.

Fischer F. G., Dörfel H., 1955. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **301**, 224.

Gee M., McCready R. M., 1957. Paper chromatographic detection of galacturonic and glucuronic acids. *Anal. Chem.*, **29**, n° 2, 257-258.

Georgeakopoulos G., Dimotaki-Kourakou V., Lydaki-Kriesi N., 1962-1963. Communication à la Sous-Commission pour l'unification des méthodes d'analyse de l'O. I. V., (Paris, mai 1962). — Communication au troisième Congrès National de Chimie (Athènes, juin 1962). — *Chimika Chronika*, 1963, **28**.

Partridge S., Westall R., 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. *Biochem. J.*, **42**, 238-249.

Rentschler H., Tanner H., 1955. Über den Nachweis von Gluconsäure in Weinen aus edelfaulen Trauben. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, Berne, **46**, n° 2, 200-208.

Ventre J., 1939. Contribution biochimique à l'étude des vins eudémisés. *Ann. Fermentations*, **5**, 13-44, 74-92.

Ann. Technol. agric., 1962, **13** (3), 309-328.

UTILISATION DE L'EFFET DÉSACIDIFIANT DES *SCHIZOSACCHAROMYCES* EN VINIFICATION DE RAISINS ACIDES

E. PEYNAUD et P. SUDRAUD

Station agronomique et œnologique de Bordeaux (Gironde)

SOMMAIRE

Les levures *Schizosaccharomyces* ont la propriété remarquable de faire fermenter l'acide malique en le transformant en alcool. Ces levures peuvent donc avoir un intérêt technologique dans la transformation des produits végétaux où l'acide malique est toujours largement représenté.

On a surtout signalé jusqu'à maintenant les dangers de la contamination par de telles levures dans certaines industries de fermentation, notamment en cidrerie. Mais également on peut penser tirer parti de leurs propriétés dans la vinification de raisins acides. Ce travail résume les études de laboratoire et les essais pratiques de vinification que nous avons effectués sur cette application. Les conclusions soulignent les difficultés d'utilisation pratique de ces levures et celles que rencontre le levurage en général lorsque, en vinification, on désire imposer une fermentation à l'aide de levures étrangères.

INTRODUCTION

Dans les régions extra-méditerranéennes, et même dans les régions du midi de la France pour certaines récoltes, les systèmes de vinification utilisés comportent généralement un processus de désacidification permettant une forte diminution d'acidité lorsqu'on passe du raisin au vin. La désacidification est plus nécessaire lorsqu'il s'agit de vins de qualité. Dans beaucoup de régions, et en particulier les années de mauvaise maturité, on s'efforce d'obtenir des vins peu acides à partir de raisins acides. Ces techniques de désacidification, biologiques ou chimiques, portent soit sur l'acide malique, soit sur l'acide tartrique. La fermentation provoque d'ailleurs, le plus souvent, une première désacidification, malgré la formation des acides de fermentation, à cause surtout de la précipitation de tartrate acide ou bitartrate de potassium. Mais ce processus naturel ne suffit pas toujours et le vinificateur est

amené à mettre en œuvre des techniques qui provoquent une diminution d'acidité : fermentation malolactique, vinification par macération carbonique, utilisation de la pourriture noble dans l'élaboration des vins liquoreux, enfin, si nécessaire, désacidifications chimiques.

La multiplicité des techniques de désacidification montre bien l'importance de ce problème. On peut se demander si la microbiologie n'offrirait pas encore d'autres possibilités de désacidification biologique. Il a semblé en effet possible de tirer parti de la propriété que présentent certaines espèces de levures, les *Schizosaccharomyces*, de faire fermenter facilement l'acide malique. Ribéreau-Gayon et Peynaud (1962) pensent qu'on pourrait demander à ces levures soit de provoquer elles-mêmes une désacidification suffisante, soit de préparer le terrain à la désacidification bactérienne. Le présent travail envisage cette possibilité pratique.

Levures métabolisant l'acide malique

Il a été observé depuis longtemps que des levures peuvent utiliser l'acide malique. Kluyver (1914) a découvert le premier qu'en anaérobiose *Schizosaccharomyces pombe* convertit une forte proportion de l'acide malique d'un milieu sucré en alcool et gaz carbonique. L'un de nous (Peynaud, 1938) a montré, à l'aide de dosages précis, qu'au cours de la fermentation alcoolique pure du moût de raisin, toutes les levures du genre *Saccharomyces* ont la propriété de faire disparaître une proportion de 10 à 25 p. 100 du taux initial d'acide malique et a émis l'hypothèse d'une véritable fermentation alcoolique de cet acide, par les stades acide oxaloacétique et acétaldéhyde.

Chalenko (1941) a isolé d'un jus de fruits une levure qui fait disparaître presqu'en totalité l'acide malique des milieux de culture ; elle appartient au genre *Schizosaccharomyces ;* il la nomma *acidodevoratus ;* il lui consacra plusieurs publications (Chalenko, 1946 ; Chalenko et Korsokowa, 1960). On trouve l'analyse de ces travaux dans la monographie de Kudrjawzew sur les levures, édition en langue allemande de 1960. En Pologne, Rzedowski et Rzedowska (1960), Rzedowska et Gorecka (1962), Bujak et Surma (1962), Jakubowska (1963) ont de même étudié la désacidification accidentelle des moûts de pommes par les *Schizosaccharomyces*, la résistance de ces levures aux antiseptiques et les méthodes de contrôle microbiologique qu'elles imposent dans l'industrie cidricole.

Dittrich (1963 *a*) a conduit des recherches très détaillées en vue de l'application d'une souche de *Schizosaccharomyces* dans la pratique vinicole. Il note la lenteur de la fermentation en comparaison avec les levures elliptiques habituelles et la prédominance rapide de ces dernières après des ensemencements mixtes. Il étudie les conditions de température, de résistance à l'anhydride sulfureux et l'influence de ces conditions sur la fermentation de l'acide malique. Il conclut à la difficulté d'utilisation pratique de ces levures. Beaucoup des résultats de cet auteur sont confirmés par nos travaux rapportés ici. Dittrich (1963 *b*), en dosant d'une manière très précise l'alcool formé par les *Schizosaccharomyces* en présence et en l'absence d'acide malique, a donné également une démonstration laissant peu de doutes sur la transformation de l'acide malique en alcool éthylique.

Fermentation alcoolique de l'acide malique

Toutefois Mayer et Temperli (1963), dans leur étude du métabolisme des *Schizosaccharomyces*, devaient apporter une preuve encore plus formelle de la fermentation alcoolique de l'acide malique, par mesure à l'appareil de Warburg du gaz carbonique dégagé et dosage enzymatique de l'alcool éthylique formé, établissant ainsi le bilan de cette transformation. Ces auteurs ont confirmé dans le cas des *Schizosaccharomyces* qu'il se forme deux molécules de gaz carbonique et une molécule d'alcool éthylique par molécule d'acide malique. La réaction globale est bien :

$$HOOC — CH_2 — CHOH — COOH \rightarrow CH_3 — CH_2OH + 2CO_2.$$

Tout comme pour les sucres, il existe donc une fermentation alcoolique de l'acide malique, qu'on pourrait appeler « fermentation maloalcoolique », de la même façon qu'il existe une fermentation lactique de cet acide, ou fermentation malolactique.

Les enzymes connus de la dégradation de l'acide malique sont les suivants :

1° *La déshydrogénase malique*, qui produit la réaction :

$$\text{Acide malique} + DPN \rightleftarrows \text{acide oxaloacétique} + DPNH.$$

C'est la réaction utilisée dans le dosage enzymatique de l'acide malique (Schneider, 1963 ; Mayer et Busch, 1963) ; la forme réduite du diphosphopyridine nucléotide (DPNH) a une absorption caractéristique dans l'ultraviolet qui permet le dosage.

2° *L'enzyme « malique »*, qui provoque la transformation :

$$\text{Acide malique} + TPN \rightleftarrows \text{acide pyruvique} + CO_2 + TPNH$$

(dans le cas de l'enzyme extrait du foie de pigeon, du germe de blé) ou :

$$\text{Acide malique} + DPN \rightleftarrows \text{acide pyruvique} + CO_2 + DPNH$$

(dans le cas de l'enzyme extrait de *Lactobacillus plantarum*).

La déshydrogénase malique intervient dans le cycle de Krebs, en présence d'air. L'enzyme « malique » peut intervenir en anaérobiose. On sait que dans le cas des bactéries lactiques qui possèdent également la déshydrogénase lactique, l'acide pyruvique issu de l'acide malique est réduit en acide lactique ; c'est la fermentation malolactique :

$$\text{Acide malique} + DPN \rightleftarrows \text{acide pyruvique} + CO_2 + DPNH.$$

$$\text{Acide pyruvique} + DPNH + H \rightleftarrows \text{acide lactique} + DPN.$$

Pour les cellules possédant la carboxylase, comme les levures, les tissus végétaux on pourrait formuler l'hypothèse suivante : l'acide pyruvique issu de l'acide malique serait décarboxylé et l'acétaldéhyde formée serait réduite en alcool éthylique :

$$\text{Acide malique} + DPN \rightleftarrows \text{acide pyruvique} + CO_2 + DPNH.$$

$$\text{Acide pyruvique} \rightarrow \text{acétaldéhyde} + CO_2.$$

$$\text{Acétaldéhyde} + DPNH \rightleftarrows \text{alcool éthylique} + DPN.$$

La fermentation est partielle ; la totalité de l'acide malique d'un moût ne subit pas cette transformation. La réaction est conditionnée sans doute par la richesse des levures en enzyme malique, mais le pH est un facteur très important. La quantité

d'acide malique fermenté est plus élevée aux pH bas ; la fermentation s'annule vers pH 4,5 à 4,8. D'après une hypothèse vraisemblable, c'est l'acide malique indissocié qui serait métabolisé, d'où une attaque plus importante à pH bas. Ce comportement peut s'expliquer également par l'influence bien connue des conditions de pH sur la perméabilité cellulaire.

On calcule que 1 g d'acide malique donne par fermentation 343 mg d'alcool et 656 mg de gaz carbonique, soit 326 ml environ. 0,1° d'alcool (soit environ 0,8 g) est formé par la fermentation de 2,33 g d'acide malique. La fermentation de 5 à 8 g d'acide malique étant parfaitement possible, on peut ainsi bénéficier dans la fermentation de raisins très acides d'un gain de 0,2° à 0,3° d'alcool.

Si l'on rapporte l'acide malique métabolisé à un poids connu de levures *Schizosaccharomyces*, on peut calculer par mesure du gaz carbonique dégagé que 1 g de levure en poids sec est capable de faire fermenter 90 à 100 mg d'acide malique par heure. Les *Schizosaccharomyces* font donc fermenter l'acide malique dix à douze fois moins vite que le sucre, puisque dans le même temps 1 g de levure peut transformer 1 000 à 1 300 mg de glucose. Ce même rapport peut être observé au cours de la fermentation des milieux naturels.

Bezzegh (1961), de la Station de Wädenswil, a fait une étude complète du métabolisme de la souche de *Schizo. acidifaciens* d'Osterwalder et montré qu'il est nettement plus lent que celui des *Saccharomyces*.

Récemment Peynaud, Mlle Domercq, Mme Boidron, Mme Lafon-Lafourcade et Guimberteau (1964) ont étudié les propriétés d'un grand nombre de souches de *Schizosaccharomyces*, notamment en ce qui concerne la fermentation de l'acide malique ; ils ont fait une étude critique de la classification des différentes espèces de *Schizosaccharomyces* selon la conception de Kudrjawzew.

Dans le présent travail nous résumons nos essais de laboratoire concernant la désacidification des jus de raisin par fermentation de l'acide malique et nos essais pratiques de vinification effectués à la récolte 1963.

EXPÉRIMENTATION

Description de *Schizosaccharomyces pombe*

Le genre *Schizosaccharomyces* comprend les levures sporogènes, faisant fermenter activement les sucres, dont la reproduction végétative se fait par cloisonnement et scissiparité, alors que les autres genres se multiplient par bourgeonnement. Les *Schizosaccharomyces* comportent trois espèces : *Schizo. octosporus* et *Schizo. versatilis*, qui forment huit spores par asques, et *Schizo. pombe* qui en forme quatre. *Schizo. pombe* a plusieurs synonymes : *Schizo. acidodevoratus, liquefaciens, formosensis, mellacei*, etc. Peynaud et coll. (1964) ont montré qu'il s'agissait exactement de la même espèce. L'opinion de Kudrjawzew, qui distingue *Schizo. pombe* (originaire de régions à climat tropical et provenant de milieux riches en amidon, millet, riz, bananes ou de mélasses de canne à sucre, et qui n'attaquerait pas l'acide malique) de *Schizo. acidodevoratus* (originaire de régions à climat tempéré et provenant de fruits charnus divers et qui attaque l'acide malique) ne nous paraît pas fondée. Toutes les levures

Schizosaccharomyces, en effet, quelle que soit leur origine, sont capables de faire fermenter l'acide malique en anaérobiose, à des degrés divers, mais toujours plus intensément que les *Saccharomyces* et les autres levures de vin.

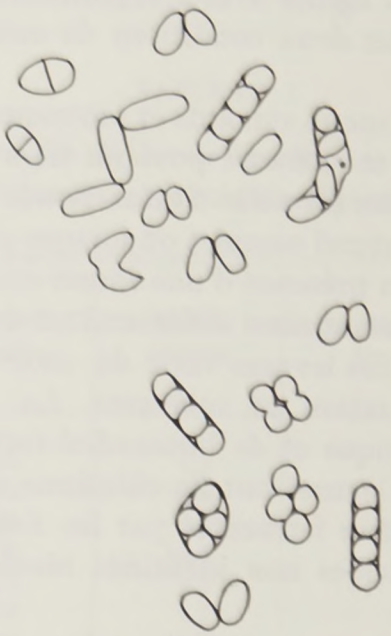


FIG. 1. — Schizosaccharomyces pombe (*souche CBS* 356) *cultivé sur milieu solide* (*en bas*) *et sur milieu liquide* (*en haut*)

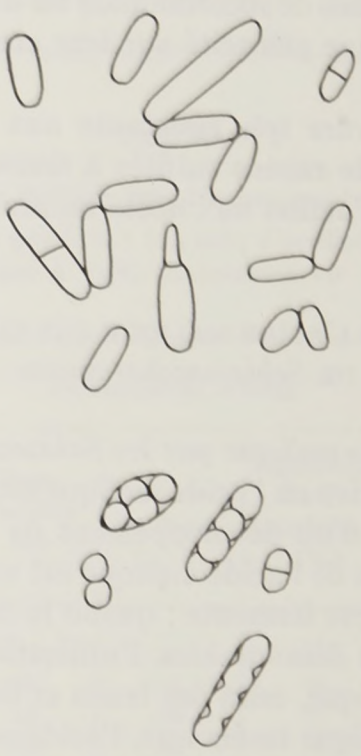


FIG. 2. — Schizosaccharomyces pombe (*souche* acidodevoratus *que nous devons à M.* RZEDOWSKI, *Varsovie*), *cultivé sur milieu solide* (*en bas*) *et sur milieu liquide* (*en haut*)

Les caractères morphologiques de *Schizosaccharomyces pombe* sont les suivants. En culture sur moût de raisin, les cellules sont cylindriques, avec les extrémités arrondies, de dimensions (3-5) × (6-16)μ. Elles se multiplient par scission (ou scissiparité) après allongement et cloisonnement interne. Les cellules restent accolées par

deux après cloisonnement. Elles donnent une fermentation active, avec formation d'un dépôt ; pas de voile en surface. Sur moût gélosé, les formes des cellules sont plus irrégulières ; quelques cellules sont sphériques ; on note la formation de spores rondes, quatre par asque. Les figures 1 et 2 reproduisent l'aspect de deux souches de *Schizosaccharomyces* dans les deux conditions de culture.

Schizo. pombe assimile les sucres suivants et provoque leur fermentation : glucose, fructose, saccharose, maltose et raffinose pour un tiers (le mélibiose n'est pas fermenté). L'utilisation des nitrates est nulle. *Schizo. pombe* est capable d'utiliser l'azote ammoniacal dans un milieu naturel complet ou lorsque c'est la seule source d'azote ; il ne l'assimile pas, ou mal, en présence d'une forme azotée plus aisément utilisable comme l'asparagine, se conduisant ainsi différemment des *Saccharomyces*.

Le pouvoir alcoogène de ces levures varie de 10,0° à 12,6° en anaérobiose et de 13,2° à 15,1° lorsque l'aération est suffisante. La formation du glycérol est importante, celle d'acide acétique et de butanediol faible. Le déficit des bilans de fermentation montre que ces levures ont un chimisme un peu différent de celui des *Saccharomyces*. Dans les milieux fermentés par les *Schizosaccharomyces*, on a noté plusieurs fois la présence d'acides non identifiés révélés par chromatographie sur papier.

Les *Schizosaccharomyces* sont auxohétérotrophes et montrent des besoins importants pour de multiples facteurs de croissance ; ils ne se multiplient pas en l'absence de mésoinositol, très peu en l'absence de nicotinamide ou d'acide pantothénique. L'acide *p*-aminobenzoïque a une certaine efficacité sur leur croissance, fait rare chez les levures.

Schizo. pombe est une levure très résistante aux antiseptiques usuels. On l'a isolé plusieurs fois de moûts de raisins sulfités à doses élevées, 50 ou 100 g/hl. De même l'acide sorbique a peu d'action aux doses habituelles.

Fermentation de l'acide malique par quelques souches de *Schizosaccharomyces*

La fermentation de l'acide malique par les *Schizosaccharomyces* n'assure pas leur croissance : une solution nutritive où l'acide malique est la seule source carbonée n'est pas, en anaérobiose, le siège d'un développement de *Schizosaccharomyces* et d'une fermentation. La fermentation de l'acide malique est seulement liée à celle du sucre ; elle se poursuit tant que le sucre fermente ; quand la fermentation du sucre s'arrête, par épuisement ou conditions défavorables, l'utilisation de l'acide malique s'arrête également. C'est l'acide *l*-malique, celui des fruits et des raisins, qui est métabolisé ; dans une solution d'acide malique racémique, l'acide malique droit n'est pas touché.

Les tableaux 1 et 2 donnent quelques résultats comparatifs de la fermentation de l'acide malique dans les moûts de raisins acides avec diverses levures de vin et avec des souches variées de *Schizo. pombe*. L'acide malique a été dosé par la méthode chimique de Peynaud (voir Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1958), contrôlée par la chromatographie sur papier.

Les levures courantes trouvées dans les vins, *Saccharomyces, Kloeckera, Saccharomycodes, Torulopsis,* ont diminué la teneur en acide malique de 16 à 37 p. 100,

alors que dans les mêmes conditions les *Schizosaccharomyces* ont consommé 65 à 80 p. 100 de l'acide malique du moût, soit jusqu'à 5 g d'acide malique par litre. La diminution d'acidité fixe exprimée en acide sulfurique a atteint 4,5 g et un moût de 9,5 g d'acidité a donné finalement un vin de 5,0 g.

TABLEAU I

Fermentation de l'acide malique par différentes levures de vin et par les Schizosaccharomyces
Moût de raisin : 130 g de sucre par litre, 194 méq d'acidité titrable ; 136 méq d'acide malique

	Acidité titrable	Acidité volatile	Perte d'acidité fixe	Acide malique	Diminution d'acide malique (%)
Sacch. ellipsoideus	196	4,9	— 3	107	21
Sacch. oviformis	194	4,9	— 5	98	28
Sacch. acidifaciens	180	5,7	— 20	85	37
Sacch. elegans	202	15,0	— 7	108	20
Sacch. rosei	196	4,5	— 2	114	16
Saccharomycodes ludwigii .	200	7,3	— 1	107	21
Torulopsis bacillaris	194	14,0	— 14	112	18
Schizo. acidodevoratus	124	2,4	— 72	48	65
Schizo. liquefaciens	102	2,8	— 95	27	80
Schizo. versatilis	115	1,8	— 81	38	72

TABLEAU 2

Fermentation de l'acide malique par diverses souches de Schizosaccharomyces
Moût de raisin : 152 g de sucre par litre ; 124 méq d'acidité titrable ; 76 méq d'acide malique
Fermentation à 25°C. Expression en méq par litre

N° des souches de *Schizo. pombe*	Fermentation aérobie			Fermentation anaérobie		
	Perte d'acidité fixe	Acide malique	Diminution d'acide malique (%)	Perte d'acidité fixe	Acide malique	Diminution d'acide malique (%)
204.....	36	36	52	44	24	68
205.....	33	24	68	58	19	75
206.....	49	16	79	56	6	92
352.....	44	23	70	50	22	71
354.....	34	31	59	34	12	84
355.....	43	16	79	53	16	79
357.....	35	31	59	38	26	66
1043	31	32	58	38	24	68
1044	39	24	68	51	16	79
1062	41	29	62	48	24	68
Valeurs moyennes.....	*38*	*23*	*65*	*47*	*19*	*75*

Le tableau 2 montre bien que tous les *Schizo. pombe* ont de fortes propriétés désacidifiantes. C'est à l'abri complet de l'air que la fermentation de l'acide malique est la plus poussée. Il s'agit bien d'une transformation anaérobie. Ici encore la désacidification observée est importante ; pour certaines levures l'acidité titrable est passée de 124 à 68 méq, malgré la formation des acides de fermentation.

Effet de la température sur le développement des *Schizosaccharomyces*

D'après Kudrjawzew (1960, p. 247) : « Les levures du genre *Schizosaccharomyces* provoquent une fermentation alcoolique énergique et se développent à des températures plus élevées que les *Saccharomycètes*. » Dittrich (1963 *a*) a trouvé également pour la souche étudiée un meilleur développement à 30°C qu'à 25°C.

Simone Domercq a déterminé les courbes de fermentation pour quelques souches de *Schizosaccharomyces*, en comparaison avec des souches de *Saccharomyces ellipsoideus* et *oviformis*, sur moût de raisin, aux quatre températures suivantes : 20°C, 25°C, 30°C et 37°C. Les figures ci-contre (3 à 7) en donnent quelques exemples.

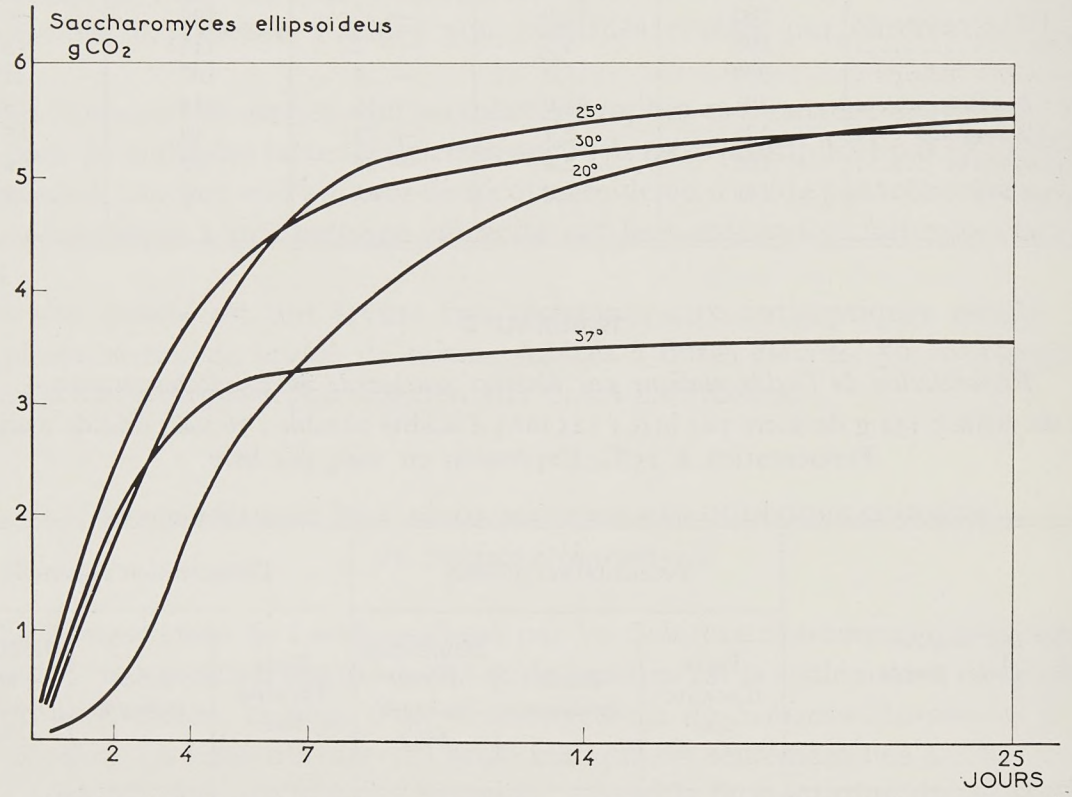


Fig. 3. — *Courbes de la fermentation à quatre températures d'un moût de raisin avec* Sacch. ellipsoideus *tracées d'après les pertes journalières de gaz carbonique*

On voit d'abord que la vitesse de fermentation par les *Schizosaccharomyces* est considérablement réduite par rapport à l'activité des *Saccharomyces*. Après sept jours de fermentation, par exemple, il y a, à 25°C, deux fois plus de sucre fermenté par les levures elliptiques que par les *Schizosaccharomyces*. Ces dernières levures cependant arrivent à fermenter autant de sucre après 25 jours. Leur pouvoir fermentatif est bon, mais leur multiplication est lente.

Pour les levures *Saccharomyces*, la courbe optimum de fermentation se situe à 25°C ; le départ est toujours plus rapide à 30°C, mais généralement après quelques

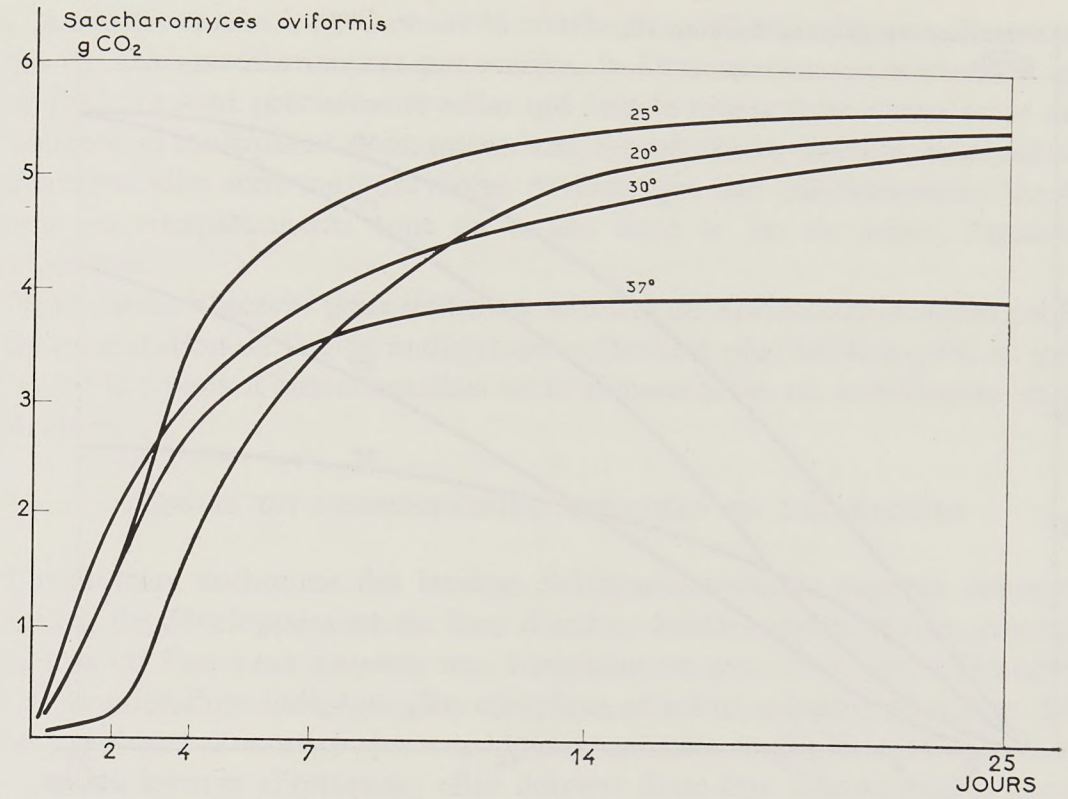


Fig. 4. — *Courbes de la fermentation à quatre températures d'un moût de raisin avec* Sacch. oviformis, *tracées d'après les pertes journalières de gaz carbonique*

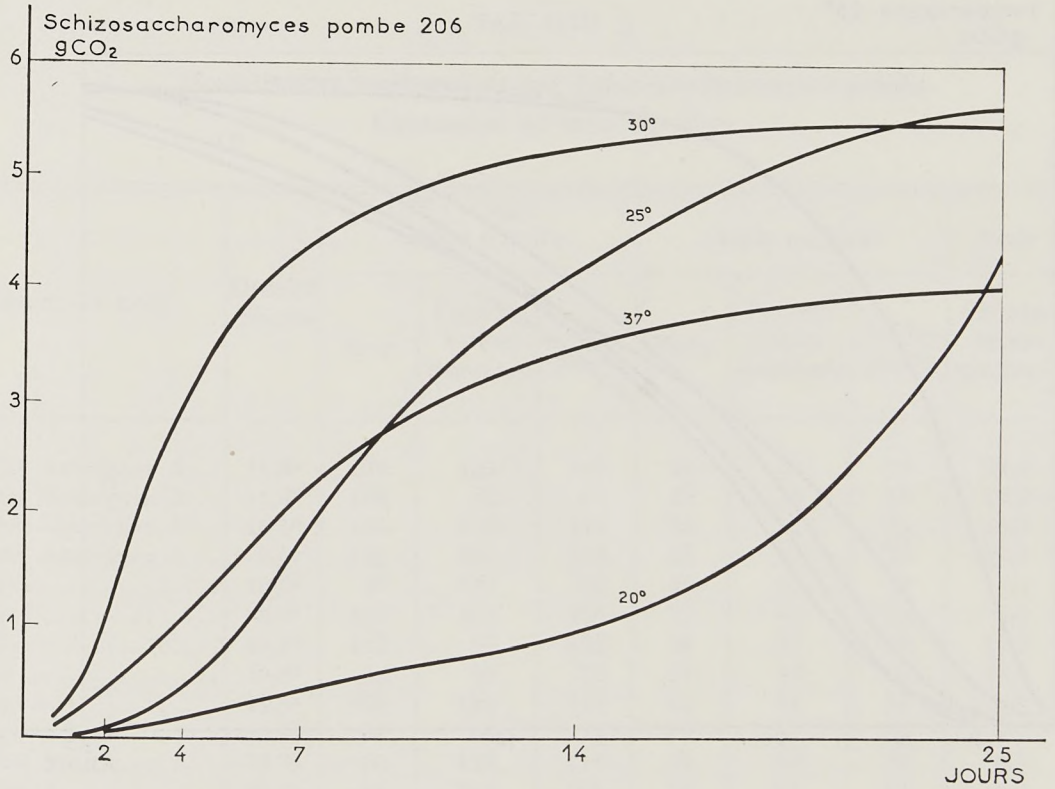


FIG. 5. — *Courbes de la fermentation à quatre températures d'un moût de raisin avec une souche de* Schizo. pombe *isolée de pâte de coing* (« INIGO », *Madrid*), *tracées d'après les pertes journalières de gaz carbonique*

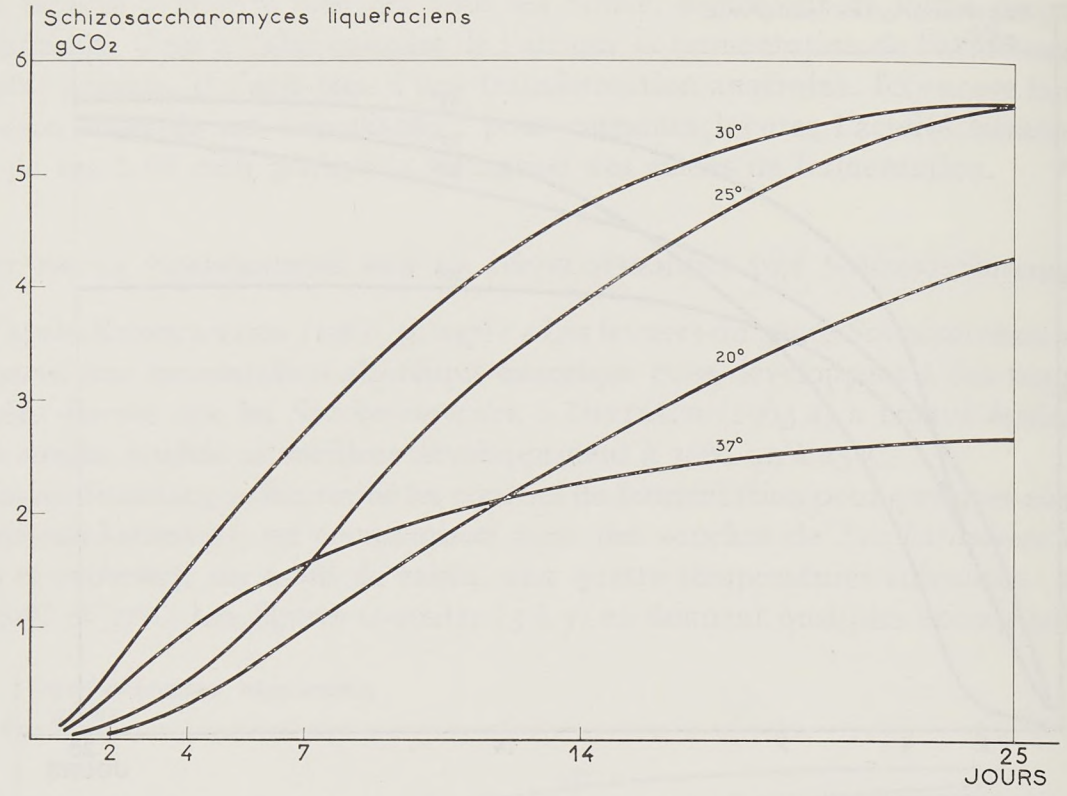


FIG. 6. — *Courbes de la fermentation à quatre températures d'un moût de raisin avec* Schizo. pombe (*souche* liquefaciens d'OSTERWALDER)), *tracées d'après les pertes journalières de gaz carbonique*

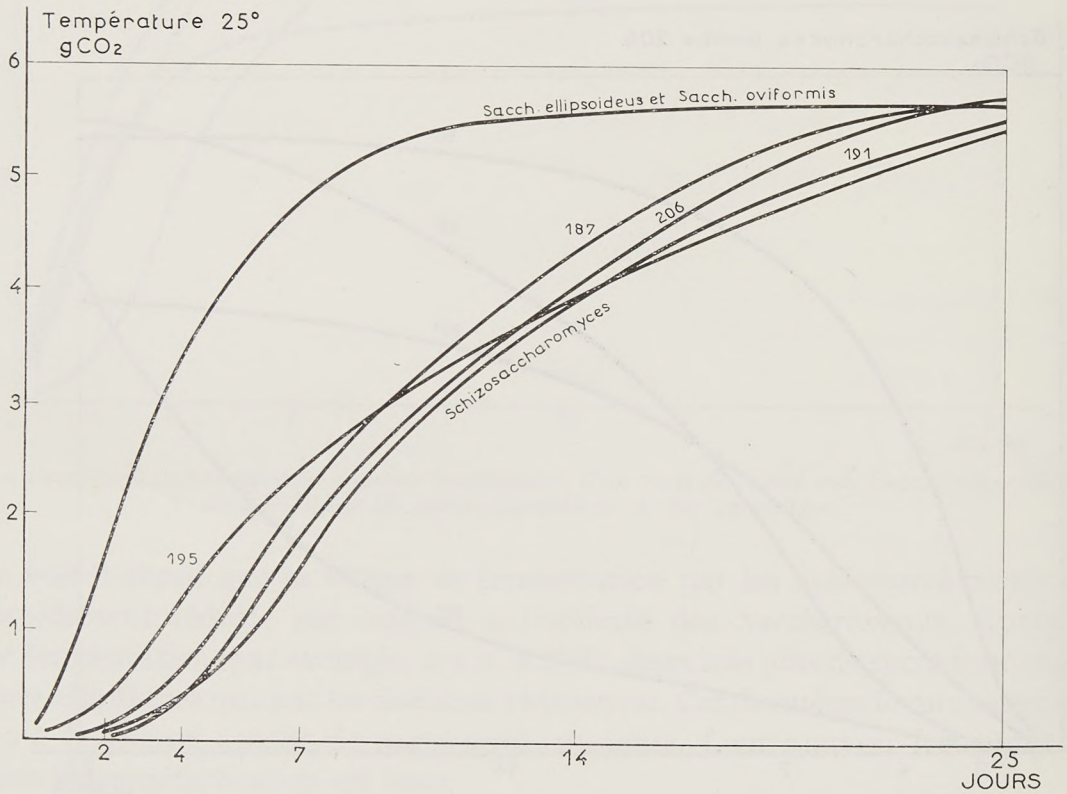


FIG. 7. — *Comparaison des courbes de fermentation des levures* Saccharomyces *et* Schizosaccharomyces ; *les courbes sont tracées d'après les pertes journalières de gaz carbonique déterminées par pesées*

jours, la courbe tracée à 25°C croise la courbe de 30°C et la dépasse. Pour certaines souches de *Schizosaccharomyces* par contre, la fermentation est nettement plus rapide à 30°C ; ce sont précisément celles qui font le mieux fermenter l'acide malique. Ces souches se multiplient donc mieux aux températures élevées, mais même à ces températures, elles sont toujours moins actives que les *Saccharomyces*, ce qui ne confirme pas complètement, tout au moins dans le jus de raisin, l'assertion de KUDRJAWZEW.

Nous avons observé, pour certaines souches de *Schizosaccharomyces* seulement, que la fermentation de l'acide malique est nettement plus faible à 30°C et 37°C qu'à 20°C et 25°C ; pour d'autres souches cette fermentation est indifférente au facteur température.

ESSAIS DE FERMENTATIONS ASSOCIÉES AU LABORATOIRE

L'utilisation technique des levures *Schizosaccharomyces* suppose connues leurs possibilités de développement en face d'autres levures concurrentes, comme dans chaque cas où l'on veut imposer une fermentation avec une levure étrangère à la place de la microflore indigène, plus complexe et mieux adaptée au milieu. Le paragraphe précédent a montré que ces levures ont une multiplication beaucoup plus lente que les levures elliptiques ; elles doivent donc être désavantagées lorsque les *Saccharomyces* se trouvent également dans le milieu de culture. Nous avons fait de nombreux essais pour fixer leur comportement en face des *Sacch. ellipsoideus* et *oviformis*.

Dans une première série d'essais, des moûts de raisins sont prélevés au vignoble

TABLEAU 3

Moûts naturels ensemencés par Schizosaccharomyces pombe
Expression en méq par litre

Nature du moût	Densité Baumé	Acidité titrable			Acide malique			Acide lactique	
		Moût	Fermentation spontanée	*Schizo. pombe*	Moût	Fermentation spontanée	*Schizo. pombe*	Fermentation spontanée	*Schizo. pombe*
Cabernet Sauvignon 1 ..	11,3°	130	123	105	51	39	21	11,3	5,3
Cabernet Sauvignon 2 ..	11,3°	100	85	83	29	21	15	17,8	8,1
Cavernet Sauvignon 3 ..	10,4°	116	143	115	58	42	24	25,7	14,4
Cabernet Sauvignon 4 ..	9,4°	112	114	113	58	17	18	13,0	6,0
Merlot 1	12,0°	93	117	97	55	35	9	2,8	13,5
Merlot 2	9,8°	138	149	106	77	66	39	4,2	1,5
Merlot 3	10,5°	101	97	102	36	22	21	12,0	11,8
Malbec	10,1°	83	98	72	57	45	29	12,4	4,7
Sauvignon 1	11,5°	108	122	115	64	31	36	13,0	2,6
Sauvignon 2	10,8°	98	96	78	49	41	24	—	—
Sémillon 1	10,7°	100	122	114	45	30	22	1,5	3,2
Sémillon 2	10,8°	85	105	101	56	17	12	2,2	1,6
Cépages blancs	9,5°	100	123	109	47	39	30	2,1	4,0

au moment même de leur préparation. Un volume est abandonné à la fermentation spontanée provoquée par la microflore indigène ; un autre volume est ensemencé par 2 p. 100 d'un levain jeune et actif d'une souche de *Schizo. pombe* attaquant l'acide malique. A la fin de la fermentation, on procède à l'analyse comparative. Le tableau 3 donne les résultats en ce qui concerne l'acidité titrable, l'acide malique et l'acide lactique.

Alors que la fermentation normale a élevé en moyenne l'acidité des moûts de 13 méq, cette acidité diminue de 6 méq quand la fermentation se fait avec ensemencement de *Schizosaccharomyces*. Sur les treize moûts essayés, l'acidité titrable du vin obtenu avec les *Schizosaccharomyces* est plus faible dans sept cas (de 14 à 53 méq) que celle du vin obtenu par fermentation spontanée, et identique ou à peu près dans six autres cas. Bien entendu lorsqu'il y a désacidification, c'est l'acide malique qui a été fermenté, mais on doit le souligner, jamais avec l'importance des fermentations pures de *Schizosaccharomyces*.

On peut en conclure que dans la moitié des cas, l'addition de 2 p. 100 de levain avant le départ spontané de la fermentation a eu un léger effet désacidifiant, mais dans l'autre moitié, il n'y a pas eu intervention des *Schizosaccharomyces* ajoutés. Ces observations laissent penser que les *Schizosaccharomyces* sont fortement concurrencés par la présence des *Saccharomyces*.

TABLEAU 4

Fermentations associées Schizosaccharomyces + Saccharomyces

Moût de raisin : 187 g de sucre par litre ; 150 méq d'acidité titrable ; 89 méq d'acide malique. Fermentation à 25°C. Expression en méq par litre

	Acidité titrable	Acide malique	Perte d'acide malique (%)
Moût témoin	150	89	—
Sacch. ellipsoideus seul	160	69	22
Schizo. pombe à 25 %	154	62	30
Schizo. pombe à 50 %	148	56	37
Schizo. pombe à 75 %	129	38	57
Schizo. pombe à 90 %	127	36	60
Schizo. pombe à 95 %	115	24	73
Sacch. oviformis seul	160	67	25
Schizo. pombe à 75 %	146	53	40
Schizo. pombe à 90 %	146	48	46
Schizo. pombe à 95 %	125	33	63
Schizo. pombe seul	94	10	88

On peut noter encore dans la fermentation naturelle une production d'acide lactique presque toujours plus forte que dans la série ensemencée. Il se peut que l'ensemencement avec les *Schizosaccharomyces* gêne le développement des bactéries lactiques, au lieu de le favoriser, comme on aurait pu le penser d'après l'amélioration des conditions d'acidité.

Le tableau 4 est relatif à des essais de fermentations associées où un moût de raisins acides est ensemencé simultanément par des proportions différentes de *Schizosaccharomyces pombe* et de *Saccharomyces* soit *ellipsoideus*, soit *oviformis*. Les populations de départ ont été réalisées exactement par numération des cellules de levains jeunes.

On voit que quand la proportion de *Schizosaccharomyces* introduite est inférieure à 25 p. 100, ces levures sont complètement éliminées, elles n'interviennent pas et il n'y a aucune désacidification finale. Les *Saccharomyces* prennent très rapidement le pas sur les *Schizosaccharomyces* et pour obtenir une désacidification notable il doit y avoir au départ une forte majorité de ces dernières levures. Il suffit d'un petit nombre de *Sacch. ellipsoideus* pour diminuer beaucoup l'attaque de l'acide malique : 5 p. 100 de *Sacch. ellipsoideus* réduisent la fermentation de l'acide malique d'un cinquième et 10 p. 100 d'un tiers. *Sacch. oviformis* concurrence encore davantage les *Schizosaccharomyces*.

Ces essais montrent que l'utilisation des propriétés désacidifiantes des *Schizosaccharomyces* dans les milieux riches en acide malique exige l'élimination à peu près complète des levures indigènes. La meilleure résistance des *Schizosaccharomyces* au sulfitage doit permettre d'exercer un effet sélectif favorable. C'est ce qu'ont étudié les essais pratiques décrits ci-dessous.

Essais pratiques d'utilisation des *Schizosaccharomyces* en vinification

Les vendanges de 1963, particulièrement riches en acide malique, convenaient bien à ce genre d'essais. Nous avons utilisé un moût de raisins blancs et de la vendange rouge. Nous décrivons dans le détail l'essai effectué en vinification en blanc, qui a donné les résultats les plus intéressants, les conditions les meilleures pour le développement des *Schizosaccharomyces* n'ayant pu être réalisées dans la vinification en rouge.

Quatre cuves métalliques émaillées de 125 l de capacité totale ont reçu 110 l de moût parfaitement homogénéisé, dont la composition était la suivante : densité 1,070 ; acidité titrable 7,00 g (en acide sulfurique) ; acide malique 7,00 g. Les moûts des quatre cuves ont subi les traitements suivants :

Cuve 1. Moût sulfité à 100 mg d'anhydride sulfureux par l, non ensemencé.

Cuve 2. Moût sulfité à 250 mg d'anhydride sulfureux par l, ensemencé 48 heures plus tard avec 5,5 l (soit 5 p. 100 du volume) d'un levain de levures indigènes.

Cuve 3. Moût sulfité à 250 mg d'anhydride sulfureux par l, ensemencé 48 heures plus tard avec 5,5 l d'un levain de *Schizo. pombe*.

Cuve 4. Moût sulfité à 100 mg d'anhydride sulfureux par l, chauffé à 70°C, refroidi et, 24 heures après, additionné de 5,5 l d'un levain de *Schizo. pombe*.

Les levains sont préparés par addition à 5 l de moût stérilisé par chauffage de 0,5 l de moût en fermentation provenant soit d'une fermentation spontanée (cuve 2), soit d'une culture pure de *Schizo. pombe* (souche *liquefaciens*) (cuves 3 et 4). On les place à l'étuve à 25°C et on les utilise lorsqu'ils sont en pleine fermentation.

La mesure journalière des densités dans les quatre cuves a permis de tracer les courbes de fermentation de la figure 8. Le départ de la fermentation est plus rapide dans le cas de fermentation spontanée, où le moût était peu sulfité, alors que la fermentation par les *Schizosaccharomyces* du moût stérilisé par chauffage a été nettement plus lente ; c'est précisément ce qu'avaient indiqué les essais de laboratoire.

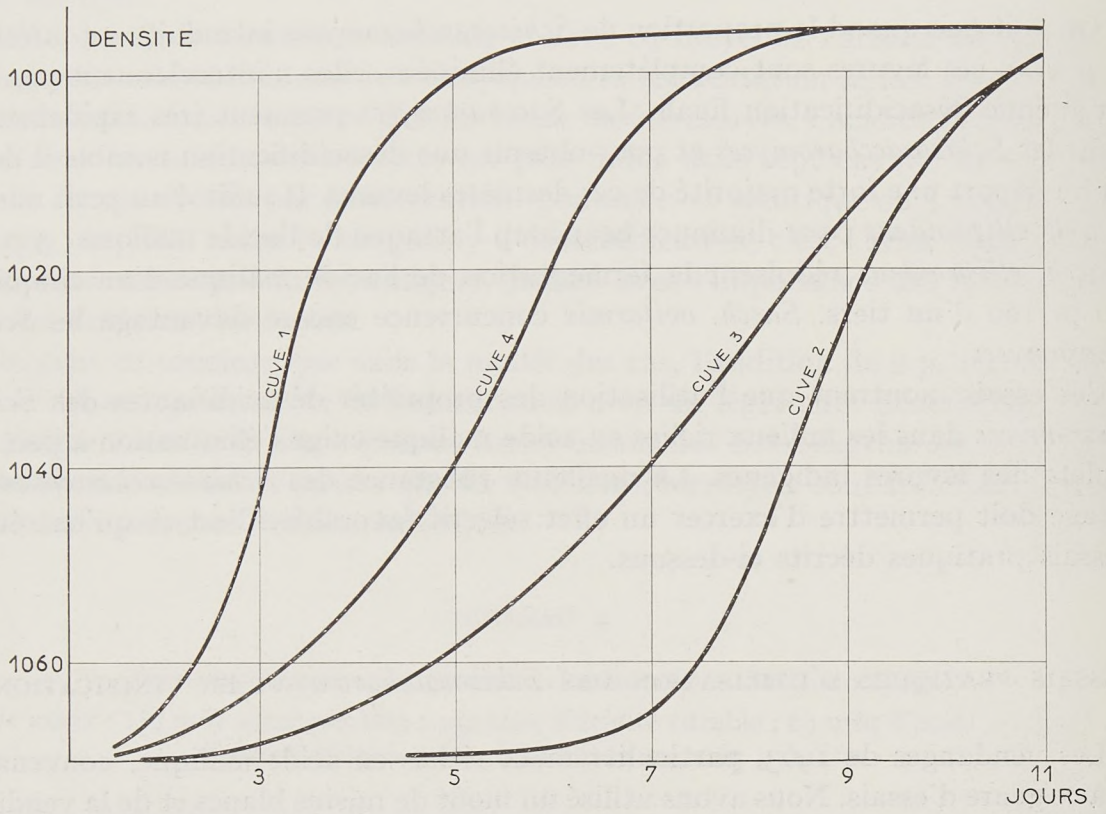


FIG. 8. — *Courbes de fermentation d'un même moût de raisins blancs traité et ensemencé de façon différente, en cuves de* 125 l.
Cuve 1 : 100 mg SO_2 par l, non ensemencé.
Cuve 2 : 250 mg SO_2 par l, ensemencé par des levures indigènes.
Cuve 3 : 250 mg SO_2 par l, ensemencé par *Schizosaccharomyces*.
Cuve 4 : 100 mg SO_2 par l, stérilisé par chauffage, ensemencé par *Schizosaccharomyces*.
Les fermentations sont suivies par la prise journalière des densités.

TABLEAU 5

Évolution de l'acidité dans la fermentation de cuves diversement ensemencées

Moût de raisin blanc, densité 1,070 ; acidité totale, 142 méq ; acide malique, 104 méq.
Estimation de l'acide malique par chromatographie sur papier. Expression en méq par litre

	Cuve 1		Cuve 2		Cuve 3		Cuve 4	
	Acidité totale	Acide malique	Acidité totale	Acide malique	Acidité totale	Acide malique	Acidité totale	Acide malique
Début de fermentation .	139	104	134	104	132	104	119	104
Moitié de la fermentation.	139	90	144	90	130	90	106	75
Fin de la fermentation ..	139	75	148	90	124	75	90	45
Soutirage.....	139	75	140	75	116	67	80	22

Enfin l'avance de la cuve 3 sur la cuve 2 montre bien la meilleure résistance des *Schizosaccharomyces* à l'acide sulfureux. L'examen microscopique qui permet de reconnaître directement les cellules de *Schizosaccharomyces* lorsqu'elles se scindent, confirme bien leur présence dans les cuves 3 et surtout 4. Le tableau 5 donne l'évolution de l'acidité totale et de l'acide malique au cours de la fermentation, le tableau 6 l'analyse détaillée des vins obtenus.

TABLEAU 6

Composition des vins obtenus dans les fermentations avec Schizosaccharomyces

Les sucres sont exprimés en g par litre ; tous les autres constituants sont exprimés en méq

	Cuve 1 Fermentation spontanée	Cuve 3 *Schizo.* après sulfitage	Cuve 4 *Schizo.* après stérilisation
Degré alcoolique	9,2°	9,2°	9,4°
Sucres réducteurs	1,5	1,5	1,4
Glycérol	49,0	—	51,0
Acidité totale	138	116	79
Acidité volatile	6,1	6,1	2,0
Acide tartrique	58,4	45,1	57,3
Acide malique	80	75	20
Acide lactique	3,2	3,5	3,8
Acide succinique	21,6	21,2	21,0

Pendant la fermentation, les variations de l'acidité titrable sont peu sensibles dans les cuves 1 et 2, alors qu'on observe une légère diminution en fin de fermentation dans la cuve 3 et une diminution importante dans la cuve 4. Une fermentation pure avec les *Schizosaccharomyces* n'a donc pu être réalisée qu'après stérilisation complète du moût par chauffage ; le sulfitage à 25 g/hl n'a pas suffi à éliminer complètement les *Saccharomyces*. On remarquera que la fermentation de l'acide malique dans la cuve 4 n'a pas été accompagnée d'une formation parallèle d'acide lactique, comme cela serait le cas si des bactéries malolactiques étaient intervenues.

Ces essais confirment qu'il est nécessaire d'éliminer complètement les levures indigènes d'un moût ou d'une vendange pour obtenir leur désacidification avec les *Schizosaccharomyces*. La stérilisation par chauffage est le procédé le plus efficace. Le sulfitage à 25 g/hl de moût blanc non débourbé n'a pas suffi et encore moins dans le cas de la vendange rouge foulée ; il aurait fallu sulfiter davantage ou éliminer les bourbes. La technique doit être d'ailleurs plus facile à appliquer à la vinification en rosé qu'à la vinification en rouge.

Un cas de fermentation spontanée avec *Schizosaccharomyces pombe*

Nous devons à M. Brugirard (Station expérimentale de la Chambre d'Agriculture des Pyrénées-Orientales) la connaissance d'un cas particulier de désacidification fortuite par des levures *Schizosaccharomyces* dans la pratique de la vinification 1963.

400 hl de moût de raisins rouges du Roussillon de 10° Baumé ont été mutés avant fermentation par 50 g d'anhydride sulfureux par hl dans le but de les soumettre à la concentration. Quelques jours après le mutage, le moût titrait 130 mg d'acide sulfureux libre par litre et 415 mg d'acide sulfureux total. Une fermentation spontanée se déclara par la suite et aboutit en quelques jours à la transformation complète du sucre. L'analyse effectuée à la fin de cette fermentation indique que l'acidité titrable était passée de 130 méq à 83 méq ; la formation d'acidité volatile était faible, 0,26 g. La chromatographie sur papier montrait la disparition de la tache d'acide malique, ce qui aurait pu laisser croire à l'accomplissement de la fermentation malolactique, mais la tache d'acide lactique restait faible ; par ailleurs il y avait peu d'acide succinique et le chromatogramme révélait la présence de petites quantités de deux acides non identifiés. L'analyse directe a confirmé l'absence à peu près complète d'acide malique et indiqué une teneur en acide lactique de 0,31 g /l, ce qui exclut l'intervention des bactéries lactiques.

L'examen microscopique des levures isolées de ce vin montre qu'il s'agissait de levures *Schizosaccharomyces*, identifiables par leur mode de reproduction, et une étude plus détaillée caractérisa l'espèce *pombe*. Ces levures avaient résisté au sulfitage et avaient déclenché une fermentation pure lorsque, par combinaison, la teneur en acide sulfureux libre était tombée à une limite assez basse. La souche de *Schizo. pombe* isolée de ce vin est celle qui attaque le plus intensément l'acide malique, parmi les souches étudiées jusqu'à maintenant.

Cet exemple montre que *Schizo. pombe* est utilisable en vinification, mais que le sulfitage nécessaire à l'élimination des levures *Saccharomyces* est extrêmement élevé.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Équilibre écologique des levures

La première conclusion qui se dégage de ces essais est la grande difficulté rencontrée lorsqu'on veut modifier la microflore naturelle d'un milieu de fermentation, c'est-à-dire l'équilibre écologique qui commande la répartition des espèces de levures dans la nature.

Les œnologues ont souvent cherché à savoir si, après ensemencement d'un moût ou d'une vendange par des levures cultivées, ce sont bien les levures ajoutées qui se multiplient et non les levures indigènes. On n'a jamais l'assurance en effet que la fermentation qui se déclare à la suite d'un levurage est réellement produite par les levures introduites et il est très difficile expérimentalement de s'en rendre compte. Pourtant cette question est importante, car ce doute peut mettre en cause la valeur pratique du levurage.

Si l'on ensemence avec des levures *Sacch. ellipsoideus*, on n'a évidemment, par la suite, aucune possibilité de contrôle de l'évolution du levain dans la vendange. Si l'on utilise une autre espèce de *Saccharomyces*, la distinction est théoriquement possible, en appliquant à des souches isolées les tests de fermentation des sucres, mais elle est difficilement réalisable, car il faudrait étudier plusieurs dizaines de souches à plusieurs reprises au cours de la fermentation, pour suivre statistiquement

la multiplication des diverses espèces en présence. A notre connaissance, une étude de ce genre n'a pas encore été réalisée.

Lorsqu'on ensemence avec *Sacch. oviformis*, il existe une autre possibilité de vérifier la densité de population de cette espèce dans le milieu en fermentation. En effet cette levure ne fait pas fermenter et n'assimile pas le galactose, alors que *Sacch. ellipsoideus* métabolise ce sucre. Une numération sur milieu gélosé au glucose donne donc la totalité des levures *ellipsoideus* et *oviformis*, tandis que les colonies obtenues sur milieu au galactose représentent seulement les cellules de *Sacch. ellipsoideus*. Cette technique est réalisable quoique difficile à appliquer, en particulier lorsqu'il y a peu de levures *oviformis* à déterminer en présence d'un grand nombre d'*ellipsoideus*. Bien que sa précision soit faible, il a été possible d'observer dans des essais de laboratoire sur moût de raisin riche en sucre, qu'en présence de *Sacch. ellipsoideus*, les levures *Sacch. oviformis* se développent plus lentement au début de la fermentation (Sudraud, 1963). Pourtant lorsque ces deux espèces sont séparées, l'évolution de la fermentation est la même (fig. 3 et 4). Pour avoir un développement semblable des deux levures, il faut avant le départ de la fermentation introduire au moins dix fois plus de *Sacch. oviformis* que de *Sacch. ellipsoideus*. Par contre dès que la proportion d'alcool dépasse 10°, *Sacch. oviformis* continue à se développer à la même vitesse, tandis que la multiplication de *Sacch. ellipsoideus* est fortement ralentie. A la fin *Sacch. oviformis* arrive à dominer.

Ces résultats confirment les observations souvent faites dans la pratique. On n'obtient pas toujours d'amélioration de la fermentation en ensemençant une vendange, sulfitée ou non, avec *Sacch. oviformis* avant la fermentation. Les résultats sont irréguliers lorsque l'ensemencement intervient après le départ de la fermentation; ils sont meilleurs lorsque le levain de *Sacch. oviformis* est ajouté à l'écoulage. Il ne suffit donc pas, pour réaliser un degré élevé et obtenir un bon épuisement du sucre, d'enrichir une vendange en *Sacch. oviformis* à l'aide d'une faible proportion d'un levain actif. Il faut préparer un pied de cuve abondant, de préférence à partir d'une vendange stérilisée par chauffage. De cette façon les levures *Sacch. oviformis* ne sont pas éliminées par l'activité des levures *Sacch. ellipsoideus* et elles arrivent à dominer à la fin de la fermentation.

Pour résoudre ces mêmes problèmes et mettre au point « une méthode permettant de déterminer si la race de levure utilisée pour la préparation du levain a réellement pris possession du milieu », Galzy (1956) a imaginé une technique différente, expérimentée en cave par Galzy et Dupuy (1957). La canavanine est un acide aminé antagoniste de l'arginine, inhibiteur des levures en milieu privé d'arginine. Or il est possible à partir d'une souche de levure déterminée d'obtenir des mutants résistants à la canavanine et ayant conservé la même activité fermentaire. En utilisant ces mutants au levurage d'un moût, on dispose de levures marquées qui pourront seules se développer et être comptées sur milieu nutritif solide contenant de la canavanine. Dans la pratique le comptage sur milieu sélectif à la canavanine ne s'est pas montré très précis, les levures perdant rapidement l'expression de leur potentialité de croissance en présence de cet inhibiteur. Dans le même ordre d'idée, on pourrait utiliser au levurage des souches de *Saccharomyces* résistantes à l'actidione (Peynaud, S. Lafon-Lafourcade et S. Domercq, 1962) qu'on pourrait repérer par la suite sur milieu additionné de cet antibiotique.

Avec les *Schizosaccharomyces*, on dispose bien de levures facilement identifiables,

par leur forme et par l'attaque de l'acide malique qu'elles produisent, mais on l'a vu, leur période de latence est plus longue que celle des *Saccharomyces*, et leur multiplication plus lente ; elles sont mal armées, dès le départ, pour une telle concurrence.

La répartition des levures dans la microflore naturelle obéit à des équilibres écologiques dont l'explication est encore mal élucidée, mais qui paraissent stables et assez universelles. C'est ainsi que les études de systématique des levures de raisins et de vins, effectuées dans tous les pays viticoles, ont donné à peu près la même répartition générale des espèces, tout au moins lorsqu'un nombre suffisant de souches a été étudié, résultant d'un très grand nombre de prélèvements. Suivant les climats, suivant l'état sanitaire des raisins, on peut rencontrer quelques espèces secondaires plus ou moins bien représentées, mais l'importance au début de la fermentation des levures asporogènes et surtout la suprématie de *Sacch. ellipsoideus* sont des données constantes tout à fait remarquables.

Prépondérance de *Saccharomyces ellipsoideus*

Ce n'est pourtant pas l'espèce la plus alcoogène, ni la plus résistante à l'alcool, ni à l'acide sulfureux, ni celle qui sporule le mieux. Ce n'est pas *Sacch. ellipsoideus* qui est l'espèce la plus répandue sur les raisins ; ce n'est pas elle qui survit après plusieurs mois dans les vins terminés. Elle ne résiste pas mieux que d'autres à des températures élevées ; elle ne se multiplie pas mieux à des températures basses. Cependant dans le cours d'une fermentation vinaire, *Sacch. ellipsoideus* représente toujours 90 p. 100 et davantage des levures en activité. On ne connaît pas les raisons exactes de cette prédominance.

On peut remarquer en outre que *Sacch. ellipsoideus* est une levure relativement peu rencontrée dans la nature lorsqu'on examine les sols, les végétaux, les fleurs, les fruits, les insectes, les animaux, etc. (Lund, 1954). On peut penser alors que *Sacch. ellipsoideus* doit être mieux adapté que les autres espèces à la fermentation anaérobie, peut-être également à l'assimilation de certaines formes azotées des moûts de raisin. Mais on peut se demander pourquoi des levures qui au premier abord paraissent aussi actives, comme *Sacch. chevalieri*, *Sacch. oviformis*, *Sacch. italicus* restent toujours très peu représentées.

Cette lutte entre espèces a été très peu étudiée et on peut se demander si *Sacch. ellipsoideus* n'aurait pas la propriété de détruire et même de lyser les cellules d'autres espèces. C'est en tout cas l'hypothèse qui vient à l'esprit lorsqu'on observe le comportement de *Kloeckera apiculata* au cours de la fermentation. Cette levure dont la population peut atteindre 100 000 et 150 000 cellules par mm^3 dans les premiers jours de la fermentation d'un moût de raisin, disparaît du champ microscopique lorsque *Sacch. ellipsoideus* se multiplie ; à la fin de la fermentation on peut être surpris de ne pas retrouver les petites levures apiculées.

Élimination des levures indigènes

La difficulté de réaliser une fermentation pure, conduite par une seule espèce, tient à la nécessité d'éliminer les levures indigènes mieux adaptées, notamment *Sacch. ellipsoideus*. La réussite du levurage est subordonnée à cette élimination et à

l'emploi d'un levain abondant. Il semble qu'un levurage avec 2 p. 100 d'un levain très actif, proportion souvent recommandée, ne suffise pas toujours ; le volume doit être porté à 5 p. 100 et peut-être même à davantage.

L'élimination des levures indigènes est mieux réalisable dans la vinification en blanc, où le moût est homogène et permet un bon mélange, que dans la vinification en rouge, où la vendange foulée, milieu compact et hétérogène, s'oppose à la répartition parfaite aussi bien d'un agent inhibiteur comme l'acide sulfureux que d'une suspension de levures. Un débourbage soigneux, après le sulfitage, concourt efficacement à cette élimination, à tel point qu'il rend le levurage indispensable.

On ne peut réussir une fermentation pure dans la pratique, c'est-à-dire conduite par une seule espèce de levures, en dehors bien entendu des cas de stérilisation complète, que grâce à la réalisation de conditions sélectives favorisant les levures ajoutées. Les seules fermentations pures de la pratique sont des cas accidentels de refermentation spontanée par des levures restées vivantes et donc depuis longtemps acclimatées au milieu : refermentation d'un vin sucré sulfité par une espèce de levures résistantes à l'alcool et à des doses moyennes d'acide sulfureux (*Sacch. oviformis, Sacch. acidifaciens*) ; refermentation d'un muté par des levures résistantes à des doses très élevées d'acide sulfureux (*Saccharomycodes ludwigii*).

Emploi des *Schizosaccharomyces*

Pour l'utilisation pratique des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisins très acides, qui était le but que nous nous étions fixé dans notre travail, il est indispensable de créer de même des conditions sélectives jouant en faveur de ces levures ; on pourra mettre à profit leur grande résistance à l'acide sulfureux ou bien stériliser le milieu par chauffage. Après nos essais, nous ne voyons, en effet, que les techniques suivantes qui soient susceptibles de donner des résultats pratiques, en utilisant toujours des levurages massifs (au moins 5 p. 100 de levain en pleine activité) :

1° Dans la vinification en blanc, muter avec une quantité suffisante d'anhydride sulfureux qui pourra être de l'ordre de 25 à 50 g/hl suivant l'acidité initiale, le pH, la température, l'état sanitaire des raisins, la propreté du matériel de la cave ; débourber soigneusement et même si possible clarifier ; ensemencer quelque temps après, alors qu'il reste encore au minimum 100 à 150 mg d'acide sulfureux libre par litre.

2° Ou bien, chauffer le moût à 75°C aussitôt après pressurage et ensemencer après refroidissement, en évitant les contaminations accidentelles.

3° Dans la vinification en rouge, opérer par macération sulfitique ; sulfiter suffisamment la vendange et répartir l'acide sulfureux par des brassages ; ceux-ci ont encore l'avantage de provoquer la diffusion de la couleur ; pressurer et ensemencer le moût ayant encore suffisamment d'acide sulfureux libre.

4° Ou bien chauffer la vendange foulée et égrappée à 75°C, avec brassage mécanique pour assurer la dissolution de la couleur, pressurer et ensemencer le moût refroidi. Dans le cas des vendanges chauffées, technique très étudiée dans certaines régions, l'ensemencement par les *Schizosaccharomyces* serait d'autant plus avantageux que la fermentation malolactique et la désacidification qu'elle entraîne sont rendues impossibles par la stérilisation.

Reçu pour publication en mars 1964.

SUMMARY

USE OF THE DE-ACIDIFYING EFFECT OF THE *Schizosaccharomyces* IN WINE MAKING FROM ACID GRAPE

The *Schizosaccharomyces* yeasts have the remarkable property of fermenting malic acid and transforming it into alcohol. These yeasts could therefore be of technological interest in connection with the transformation of vegetable products, in which malic acid is always present in large amounts.

Hitherto, chiefly the dangers of contamination by such yeasts in certain fermentation industries, such as cider-making, have been highlighted ; on the other hand, these properties could also be turned to good account in wine making from acid grapes. This report summarises laboratory studies and practical experiments in wine-making, which we have carried out with such an aim. The conclusions underline both the difficulties encountered in the practical utilisation of these yeasts and those associated in general with the addition of foreign yeasts in wine-making to bring about fermentation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BEZZEGH T., 1961. *Gärungs- und Atmungsversuche mit* Schizosaccharomyces pombe. Thèse doctorat, Zürich.

BUJAK S. et SURMA W., 1962. Influence de certains antiseptiques sur la vitalité des levures *Schizosaccharomyces acidodevoratus*. *Przem. Spez.*, **16**, 139.

CHALENKO D. K., 1941. *Les causes de la diminution de l'acidité pendant la fermentation des vins de fruits.* Laboratoire central d'œnologie, Moscou, 1946. Thèse Académie agricole.

CHALENKO D. K. et KORSAKOBA T. F., 1960. Les causes de la diminution d'acidité des moûts de pommes et cidres. *Mikrobiologija*, **29**, 587.

DITTRICH H. H., 1963 *a*. Versuche zum Apfelsäureabbau mit einer Hefe der Gattung *Schizosaccharomyces*. *Wein-Wissens.*, **18**, 392.

DITTRICH H. H., 1963 *b*. Zum Chemismus des Apfelsäureabbaues mit einer Hefe der Gattung *Schizosaccharomyces*. *Wein-Wissens.*, **18**, 406.

GALZY P., 1956. Essais de contrôle de l'efficacité d'un levurage. *Progrès agric. vitic.*, **145**, 95.

GALZY P. et DUPUY P., 1957. Perspectives d'utilisation d'une levure mutante à la canavanine pour le contrôle du levurage. *Ann. Technol., agric.*, **6**, 235.

JAKUBOWSKA J., 1963. Contamination microbienne des moûts de pommes sulfités. *Zest. Naukowe Politechn. Lodzkiej*, **54**, 5.

KLUYVER A. J., 1914. *Biochemische Suikerbepalingen.* Thèse, Delft.

KUDRJAWZEW W. I., 1960. *Die Systematik der Hefen.* Academie Verlag, Berlin.

LUND A., 1954. *Studies on the ecology of yeasts.* Munksgaard, Copenhague.

MAYER K. et BUSCH I., 1963. Uber eine enzymatische Apfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **54**, 60.

MAYER K. et TEMPERLI A., 1963. The metabolism of *l*-malate and other compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Microbiol.*, **46**, 321.

PEYNAUD E., 1938. L'acide malique dans les moûts et les vins de Bordeaux. *Ann. Falsif. Fraudes*, **31**, 332.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S. et DOMERCQ S., 1962. Sur quelques souches de *Saccharomyces* résistantes à l'actidione et à la streptimidone. *Ann. Inst. Pasteur*, **102**, 469.

PEYNAUD E., DOMERCQ S., BOIDRON AM, LAFON-LAFOURCADE S. et GUIMBERTEAU G., 1964. Études des levures *Schizosaccharomyces* métabolisant l'acide *l*-malique. *Archiv. für Mikrob.*, **48**, 150.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins.* Béranger, Paris, p. 124.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1962. Application à la vinification de levures métabolisant l'acide malique. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **48**, 558.

RZEDOWSKI W. et RZEDOWSKA H., 1960. *Recherches sur la désacidification biologique des moûts de fruits.* Institut des Industries de Fermentation, Varsovie.

RZEDOWSKA H. et GORECKA, 1962. Contrôle microbiologique dans l'industrie vinicole. *Przem. Fermentacying*, **62**, 66.

SCHNEIDER E., 1963. Neueste enzymatische Bestimmungsmethoden für Milch- und Apfelsäure in Wein. *Mitt. Fachgr. Lebensm. gericht. Chem.*, **17**, 1.

SUDRAUD P., 1963. *Étude expérimentale de la vinification en rouge.* Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (3) 329-354.

MISE AU POINT

SYNTHÈSE DES STEROLS PAR LA LEVURE

J. MAUGENET et P. DUPUY

Station de Technologie végétale, La Sablière, Versailles (Seine-et-Oise)

PLAN DU MÉMOIRE

A. — Les stérols de la levure

I. Les divers stérols des levures.
II. Teneur en ergostérol des levures.
  a) Variations par rapport au genre.
  b) Variations par rapport à l'espèce.

B. — Méthodes de détermination des stérols de la levure

I. Extraction.
II. Dosages.
  a) Colorimétrie.
  b) Spectrophotométrie.
  c) Procédés chromatographiques.

C. — Biosynthèse des stérols

I. Relations entre la synthèse des stérols et celle des lipides.
II. Les précurseurs de l'ergostérol.
  a) Lanostérol.
  b) Squalène.
  c) Acide mévalonique.
  d) Acétate.
  e) Autres précurseurs.
  f) Interconversion des stérols.
III. Rôle physiologique des stérols.
  a) Les stérols comme facteur de croissance.
  b) Stérols des particules.
  c) Stérols de la membrane.

D. — Influence des conditions du milieu sur la synthèse de l'ergostérol

I. Alimentation carbonée.
  a) L'acétate.
  b) L'éthanol.
  c) Le glucose.
  d) Le succinate et le glycérol.
II. Alimentation azotée.
III. Aération.
IV. Teneur des cellules en Co A.
V. Les compétiteurs des stérols.
VI. L'irradiation.

Les stérols constituent une fraction importante des lipides de la levure et ils intéressent, aussi bien le biochimiste qui cherche à comprendre leur formation et leur fonction, que le chimiste industriel pour lequel la levure constitue la source la plus importante d'ergostérol dans la nature. Cette mise au point a pour but d'exposer nos connaissances sur les divers stérols des levures, sur leur dosage et d'examiner ensuite comment se fait leur synthèse et quels sont les facteurs capables de la favoriser.

A. — LES STEROLS DE LA LEVURE

Parmi les lipides insaponifiables, les stérols groupent l'ensemble des corps qui présentent 4 cycles carbonés dont 3 cyclohexaniques (noyau stérane). Les stérols trouvés dans la levure sont des dérivés correspondant à un hydrocarbure en C_{27} : le cholestane.

Ce sont des substances neutres contenant une fonction alcool, cristallisant séparément ou en mélange intime avec d'autres stérols. C'est pour cette raison que l'isolement de stérols particuliers présentait de grandes difficultés avant l'apparition des techniques chromatographiques. Il s'ensuit que certains renseignements relatifs à la distribution des stérols dans différentes espèces de levure mériteraient d'être confirmés par des techniques plus sûres.

I. — Les divers stérols des levures

Tanret (1889) est le premier à isoler un stérol de l'ergot de seigle ; il lui donne le nom d'ergostérol. On le retrouve ensuite chez de nombreux champignons inférieurs et principalement chez les levures. De nombreuses recherches ont été faites sur la teneur de la levure en ergostérol car il en est le stérol principal. Celle-ci reste toujours la source la plus importante à partir de laquelle est extrait l'ergostérol commercial.

Smedley Mac Lean (1928) trouve dans la levure un stérol ayant des propriétés différentes de celles de l'ergostérol : il l'appelle le zymostérol.

Callow (1931) identifie un nouveau stérol comme l'α-dihydroergostérol. Celui-ci fut par la suite étudié par Wieland et Benend (1943) qui établirent définitivement sa structure comme le 5-dihydroergostérol. En fait le zymostérol et le 5-dihydroergostérol se retrouvent dans l'ergostérol commercial (Shaw et Jefferies, 1953) et peuvent être considérés comme des stérols non négligeables de la levure.

Wieland et ses collaborateurs, au cours de recherches sur les résidus de production industrielle de l'ergostérol, caractérisèrent de nombreux stérols mineurs dont les principaux sont représentés par :

— l'épistérol et l'hypostérol (Wieland et Gough, 1930) ;

— l'ascostérol et le fecostérol (Wieland, Rath et Hesse, 1941).

Il est à noter que ceux-ci n'ont pas été isolés directement de la levure. La structure de l'hypostérol n'a pas encore été établie. L'ascostérol peut être transformé en fecostérol par isomérisation.

Le néostérol a été trouvé dans la levure par WIELAND et ASSANO (1929) et signalé à nouveau par CALLOW (1931) comme une impureté de l'ergostérol. Les propriétés chimiques et physiques sont décrites par WIELAND, RATH et HESSE (1941) qui pensent qu'il s'agit d'un nouveau type de stérol. Mais d'après les travaux de BARTON (1945), BARTON et COX (1948), ce composé ne serait qu'un mélange bien cristallisé d'ergostérol et de 5-dihydroergostérol, ainsi que l'avait déjà signalé CALLOW (1931).

Le ceveristérol est un autre stérol mineur isolé par HONEYWELL et BILLS (1932, 1933). Quantitativement il représente 10 g pour 4 500 kg de levures sèches. Il a la particularité de ne pas précipiter sous forme de digitonide. Sa formule a été établie par ALT et BARTON (1952), mais il est possible que ce stérol, qui est un produit d'oxydation de l'ergostérol, soit formé au cours des opérations d'extraction (BREIVIK, OWADES et LIGHT, 1954).

Plus récemment, BREIVIK, OWADES et LIGHT (1954) découvrent dans les levures de brasserie un nouveau stérol qui s'y trouverait en quantité importante : le 24 (28)-déhydroergostérol. D'après BREIVIK et OWADES (1957), dans les conditions usuelles de culture des levures de boulangerie, le stérol prédominant est l'ergostérol (environ 80 %), vient ensuite le 24 (28)-déhydroergostérol. Tous les autres stérols peuvent être considérés comme constituants mineurs.

Dans l'étude de la biosynthèse de l'ergostérol, on verra que le lanostérol représente avec le squalène un des produits intermédiaires du métabolisme. On peut donc considérer le lanostérol comme un stérol de la levure particulièrement important à cause de son rôle métabolique (KODICEK et ASHBY, 1957).

On ne peut cependant pas affirmer que les divers stérols rencontrés dans la levure coexistent dans chacune des espèces ou des souches. L'espèce et les conditions de culture peuvent jouer un rôle important. Il est à noter que les divers stérols ont toujours été isolés de cultures industrielles (levures de brasserie ou de boulangerie) qui sont loin de représenter tous les critères de pureté de genres ou d'espèces et qui peuvent aussi être contaminées par les stérols apportés par le milieu de culture.

II. — TENEUR EN ERGOSTÉROL DE LA LEVURE

L'ergostérol représente le stérol majeur de la levure : environ 80 p. 100. Les méthodes d'investigation rapides dosent l'ensemble des stérols de la levure, aussi les résultats sont-ils exprimés généralement en ergostérol.

La teneur en ergostérol varie avec les conditions de culture et aussi suivant le genre, l'espèce et la souche de la levure considérée.

On doit noter que la formation d'ergostérol n'est pas commune à tous les genres de champignons ; elle s'observe cependant chez *Penicillium* et *Aspergillus*.

a) *Variations par rapport au genre*

BILLS, MASSENGALE et PRICKETT (1930), les premiers, déterminent la teneur en ergostérol de plusieurs levures cultivées sur mélasse. L'étude porte sur 29 souches appartenant à 13 espèces réparties dans les 5 genres : *Endomyces*, *Nadsonia*, *Myco-*

derma, Saccharomyces et *Zygosaccharomyces*. La teneur en ergostérol exprimée par rapport au poids sec varie de 0,2 à 0,3 p. 100, sauf pour les levures du genre *Saccharomyces*. La teneur maximale rapportée par ces auteurs est de 2,4 p. 100 pour *S. carlsbergensis* (souche ATCC 2345) pour une récolte de 7,5 g/l.

Usdin et Burrell (1952) donnent quelques renseignements sur la teneur en stérol de *Rhodotorula gracilis*. Sur 9 échantillons examinés, alors que les lipides totaux varient de 20,2 à 44,1 p. 100, la fraction non saponifiable représente 8,6 p. 100 des lipides totaux et 2,7 p. 100 du poids sec de la levure. La teneur en stérols représente 0,42 p. 100 du poids sec des cellules. Parmi eux l'ergostérol fut identifié et deux autres stérols furent en outre mis en évidence. D'après cette étude, on peut remarquer que les levures productrices de lipides ne contiennent pas plus de stérols que les levures non spécialisées dans l'accumulation des graisses.

Dulaney, Stapley et Simpf (1954) firent l'étude systématique de 146 cultures de levures appartenant aux genres suivants :

Candida	*Cryptococcus*	*Debaryomyces*
Dipodascus	*Endomyces*	*Endomycopsis*
Hansenula	*Kloeckera*	*Nadsonia*
Nematospora	*Pichia*	*Rhodotorula*
Saccharomyces	*Saccharomycodes*	*Schizosaccharomyces*
Schwanniomyces	*Sporobolomyces*	*Taphrina*
Torulopsis.		

Le genre *Brettanomyces* est l'un des rares à ne pas figurer sur cette liste. La teneur en stérol des levures autres que *Saccharomyces* est uniformément basse : jamais supérieure à 0,4 p. 100 et plus fréquemment inférieure à 0,1 p. 100. Une exception cependant pour une culture de *K. africana*, mais le fait n'a pu être reproduit. Le meilleur producteur s'est révélé être le genre *Saccharomyces*. La meilleure souche appartient à *S. cerevisiae*, elle a produit 3,9 p. 100 d'ergostérol pour une croissance limitée à 4,5 g/l.

Appleton, Kieber et Payne (1955) ont refait une étude systématique sur les 17 genres suivants :

Ashbya	*Candida*	*Cryptococcus*
Debaryomyces	*Endomycopsis*	*Hansenula*
Kloeckera	*Mycoderma*	*Oospora*
Pichia	*Rhodotorula*	*Saccharomyces*
Schizosaccharomyces	*Schwanniomyces*	*Trigonopsis*
Zygopichia	*Zygosaccharomyces.*	

Ils se sont trouvés en parfait accord avec Dulaney, Stapley et Simpf (1954) : le genre *Saccharomyces* est celui qui produit la plus grande quantité de stérols.

D'une façon générale, les levures de la famille des *Endomycetaceae* contiennent plus de stérols que celles de la famille des *Cryptococcaceae*. Feraient exception à cette règle : *Trigonopsis variabilis* de Appleton, Kieber et Payne (1955) et *Rhodotorula gracilis* de Usdin et Burrell (1952). Cette variation quantitative de la teneur en stérols bruts semble offrir une possibilité de séparation dichotomique des deux familles.

b) *Variations par rapport à l'espèce*

Il apparaît aussi des différences dans la teneur en stérol à l'intérieur du même genre. C'est ainsi que chez *Saccharomyces*, Dulaney, Stapley et Simpf (1954) notent 3 espèces seulement : *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae* et *S. oviformis* qui ont une production en ergostérol supérieure à 2 p. 100 du poids sec. Des différences considérables existent même à l'intérieur de l'espèce, ainsi sur 21 souches de *S. cerevisiae* examinées, la teneur en ergostérol varie de 0,1 à 8,5 p. 100 après 7 jours de croissance. Appleton, Kieber et Payne (1955) arrivent à la même conclusion mais ils n'observent cependant pas de variations aussi grandes.

Dulaney, Stapley et Simpf (1954) notent aussi que cette spécialisation se rencontre également chez les levures industrielles ; les levures de brasserie sont celles qui ont les plus fortes teneurs en stérols, viennent ensuite les levures de boulangerie.

B. — MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES STÉROLS DE LA LEVURE

De nombreuses méthodes ont été mises au point tant pour l'extraction de la fraction insaponifiable, que pour la détermination des stérols de la levure. Leur nombre même et leur diversité sont le témoignage des difficultés rencontrées dans ces dosages.

Généralement les procédés d'extraction mettent en œuvre une digestion des cellules en milieu alcalin, suivie d'une extraction de l'insaponifiable par un solvant non miscible. Parfois les stérols sont précipités sous forme de digitonide, mais le plus souvent ils sont déterminés directement dans l'insaponifiable par colorimétrie ou spectrophotométrie.

I. — Extraction

L'extraction quantitative des stérols de la cellule pose les mêmes problèmes que l'extraction des lipides totaux. Comme une partie des stérols existe dans les lipides sous forme d'esters, l'extraction devra faire intervenir une saponification préalable. Ce traitement produit en même temps la destruction des parois cellulaires et facilite l'extraction. Cependant on est limité dans la recherche des meilleures conditions d'extraction par la nécessité de ne pas détruire les stérols libérés. Cette partie du dosage est donc très conventionnelle et habituellement les auteurs ont adopté les conditions qui permettent d'obtenir la valeur maximale des stérols à partir d'un échantillon déterminé. On n'est pas pour cela certain d'avoir extrait la totalité des stérols. Lorsqu'on a en vue le contrôle de fabrication, on peut, comme l'ont fait Pesez et Herbain (1949), choisir les conditions d'hydrolyse qui donnent les mêmes résultats que l'extraction suivie de cristallisation. Bills, Massengale et Prickett (1930) proposent d'utiliser une extraction directe des levures sèches avec un mélange éthanol-benzène, Wenck, Peterson et Grenne (1935) proposent une extraction directe à l'éthanol suivie d'une saponification, Castille et Ruppol (1933) utilisent la saponification suivie d'une extraction et d'une précipitation à la digitonine pour isoler la fraction stérol. L'ergostérol, ainsi que la plupart des stérols naturels, sont précipités d'une façon à peu près quantitative par la digitonine. Le

composé équimoléculaire obtenu est stable et insoluble dans l'alcool. Lorsque la prise d'essai est suffisante, les stérols peuvent être estimés par gravimétrie. Le cerevistérol ne précipite cependant pas par cette réaction. Comme il n'existe qu'en très faible proportion c'est là une cause d'erreur très minime. Les méthodes de précipitation à la digitonine ne permettent pas de doser les stérols qui se trouvent sous forme estérifiée.

D'autres méthodes similaires ou approchantes ont été étudiées sur les moisissures ou les levures et décrites par divers auteurs : Preuss et *al.* (1931) ; Bilger, Halden et Zacherl (1934) ; Bernhauer et Patzelt (1935) ; Zorkoczy (1940) ; Cavallito (1944).

Plus récemment, des études systématiques ont été entreprises par certains chercheurs en particulier sur le mode de saponification et plus précisément sur les effets de la concentration alcaline. Mais là encore, les avis sont partagés et il semble difficile de trouver la méthode idéale comportant une extraction quantitative sans détérioration des stérols.

Shaw et Jefferies (1953) préfèrent la saponification par la potasse plutôt que par la soude et montrent qu'on peut utiliser des concentrations de 20 à 50 p. 100 suivant la température et la durée de l'opération. Ils préconisent une saponification de 2 heures avec la potasse à 40 p. 100. Lorsque la concentration en potasse atteint 50 p. 100, il y a danger de destruction de l'ergostérol. L'extraction est effectuée ensuite à l'éther et l'ergostérol est séparé et purifié par précipitation à la digitonine.

Au contraire Stoudt et Foster (1954) basent leur procédé sur le fait que la plus grande partie de l'ergostérol est présente dans la cellule sous forme d'ergostérol libre ou d'esters d'acides gras ; sous ces formes, l'ergostérol est donc facilement extractible par un grand nombre de solvants organiques. Ils emploient deux procédés avec ou sans saponification, et obtiennent une bonne corrélation entre les résultats. Les cellules séchées sont finement pulvérisées, tamisées et les échantillons (de 200 à 500 mg) subissent soit une extraction directe au Soxhlet avec éther pendant 6 heures, soit une saponification par la potasse à 8 p. 100 dans l'éthanol à 95 p. 100, la réaction étant poursuivie sous reflux pendant 6 heures. L'extrait à l'éther est évaporé et repris dans le chloroforme pour la mesure colorimétrique tandis que dans le deuxième procédé l'ergostérol est cristallisé dans l'éthanol. C'est le premier procédé qui a été utilisé au cours des études de Dulaney, Stapley et Simpf (1954).

Kieber, Payne et Appleton (1955) préfèrent une digestion alcaline à une digestion à l'acide sulfurique. L'hydrolyse par la soude à 5 p. 100 pendant une heure à 120°C est considérée comme la meilleure. L'extraction avec l'éther éthylique se révèle plus efficace que celle avec l'éther de pétrole. Ce procédé a été employé dans les travaux de Appleton, Kieber et Payne (1955) sur la teneur en stérol des levures et des moisissures.

Breivik et Owades (1957) utilisent une saponification par la potasse alcoolique des levures sèches ou humides (KOH à 25 p. 100), de 1 h 30 à 85-90°C, sous reflux. L'extraction est effectuée avec le *n*-heptane. Cette technique réduit au minimum l'extraction des substances gênantes dans le dosage spectrophotométrique de l'ergostérol.

L'extraction peut aussi être précédée d'un traitement en milieu acide. Pesez et Herbain (1949) proposent d'utiliser l'acide formique à 40°C, pendant 18 heures, en tube scellé et de faire une extraction du produit séché par un mélange chloroforme-acétone. Ce procédé aurait l'avantage de diminuer les pertes par oxydation qui se produisent au cours du passage à chaud en milieu alcalin.

II. — Dosages

La digitonine a depuis longtemps été employée comme agent précipitant des stérols et le poids du précipité donne un moyen de détermination des stérols totaux (Penau et Hardy, 1929). Bien que l'ergostérol ne représente que 24-25 p. 100 du poids du complexe insoluble, la méthode gravimétrique manque de sensibilité pour beaucoup de recherches. Cependant, si la digitonine conserve sa valeur comme moyen de purification des extraits, les méthodes de mesures les plus employées reposent sur des réactions colorées et sur l'absorption dans l'ultraviolet. Les méthodes chromatographiques se sont révélées très précieuses pour la séparation des divers stérols et de leurs précurseurs, malgré leur précision assez faible.

a) *Colorimétrie*

La plupart des méthodes colorimétriques d'analyse des stérols sont basées sur la réaction colorée de Liebermann-Burchard. Une solution de stérol dans le chloroforme est traitée par l'anhydride acétique et l'acide sulfurique. Après un bref délai une succession de couleurs apparaît, caractéristique des stérols.

Cette coloration a été rendue quantitative par de nombreux auteurs : Schoeheimer et Sperry (1934) ; Schoenheimer, Dam et Gottenberg (1935) ; Moore et Baumann (1952) ; Idler et Baumann (1953). Elle est largement employée sous la forme décrite par Stoudt et Foster (1954). Les extraits à l'éther sont séchés et repris dans le chloroforme. Des échantillons contenant de 0,1 à 0,4 mg d'ergostérol sont mis dans des tubes calibrés avec le réactif de Liebermann-Burchard. La température est maintenue constante (25°C) et les absorptions sont lues au colorimètre à des intervalles de temps déterminés, aux 2 absorptions maximales dans le visible (420 mμ et 670 mμ).

La méthode n'est pas spécifique de l'ergostérol et des couleurs similaires peuvent être données par beaucoup d'autres stérols et composés voisins (Shaw et Jefferies, 1953). D'autre part, les divers stérols et leurs esters n'ont pas une intensité de coloration maximale au même moment (Idler et Baumann, 1953). Les solutions d'ergostérol dans le chloroforme ne sont pas stables et, en général, on considère que les méthodes colorimétriques ne peuvent donner satisfaction (Breivik et Owades, 1957) pour des recherches très précises. Elles sont cependant bien suffisantes pour des investigations rapides.

Il existe aussi une autre méthode colorimétrique, utilisant l'anhydride acétique et le chlorure de zinc, employée par Pesez et Herbain (1949). Elle apparaît être spécifique de l'ergostérol parmi les stérols de la levure, mais elle donne des résultats difficilement reproductibles d'après Shaw et Jefferies (1953).

b) *Spectrophotométrie*

La méthode la plus satisfaisante pour déterminer de petites quantités d'ergostérol est basée sur les mesures d'absorption dans l'ultraviolet (Shaw et Jefferies, 1953).

Le spectre de l'ergostérol est caractéristique des stérols insaturés Δ — 5 : 7 (Huber, Ewing et Kriger, 1945). Les absorptions maximales dans l'alcool absolu sont situées à 271,5, 282, 293,5 mμ avec une inflexion à 263 mμ et une plus petite dans la région de 253 mμ. Dans le chloroforme, elles sont très légèrement déplacées : 274,5, 284,5 et 296,0 mμ. La difficulté des méthodes spectrophotométriques réside dans la purification de l'extrait et l'instabilité de l'ergostérol particulièrement gênante en solution diluée.

Bills, Massengale et Prickett (1930) proposent une méthode dans laquelle, les composés qui interfèrent dans le dosage à cause de leur absorption dans l'ultraviolet sont partiellement éliminés par un traitement de la levure au méthanol. Après filtration et séchage, l'ergostérol est extrait par un mélange éthanol-benzène. Cet extrait est ensuite évaporé, repris dans l'alcool absolu et l'absorption est mesurée à 282 mμ.

D'après Shaw et Jefferies (1953) qui ont consacré des études très détaillées à ce sujet, cette méthode ne peut donner satisfaction, car le traitement au méthanol est jugé insuffisant, en particulier pour éliminer les substances interférant à 282 mμ. Ils proposent une séparation de l'ergostérol dans l'extrait insaponifiable par précipitation à la digitonine. Les non-stérols montrant une absorption étrangère dans la même région que l'ergostérol sont ainsi éliminés. On a reconnu que cette précipitation est bien quantitative et que les stérols séparés de cette manière donnent des solutions au spectrophotomètre identiques, au-dessus de 260 mμ, à celles de l'ergostérol purifié.

Cette méthode de détermination de l'ergostérol, basée sur l'absorption dans l'ultraviolet, a peu de chance de subir une interférence avec les autres stérols présents dans la levure. En effet, le 5-dihydroergostérol et le zymostérol ne possèdent pas le système diène conjugué responsable du spectre d'absorption et ne présentent pas de bande d'absorption à 282 mμ. Les stérols mineurs : ascostérol, fecostérol, épistérol qui sont des isomères du zymostérol, devraient se comporter de la même façon.

Diverses méthodes de dosage tenant compte de ces résultats ont été proposées.

Shaw et Jefferies (1953) donnent une semi-micro méthode rapide basée sur la saponification et l'extraction unique avec du cyclohexane, la teneur en ergostérol étant déterminée par son coefficient d'extinction corrigé à 282 mμ.

Stoudt et Foster (1954), après saponification des levures à la potasse alcoolique, cristallisation des stérols dans l'éthanol, solubilisation des cristaux dans le chloroforme, établissent leurs calculs sur la différence d'absorption entre 285 mμ et 296 mμ.

Breivik et Owades (1957) saponifient de même par la potasse alcoolique mais opèrent l'extraction avec du *n*-heptane et font la lecture de l'absorption à 281,5 et 230 mμ, sur une solution d'heptane dilué dans l'alcool absolu. Cette méthode permet de séparer l'ergostérol du 24 (28)-déhydroergostérol, la teneur en ergostérol étant mesurée à 281,5 mμ et le 24 (28)-déhydroergostérol à 230 mμ.

Au travers de ces divers travaux, on peut considérer que ces méthodes, basées sur la mesure d'absorption dans l'ultraviolet, sont spécifiques de l'ergostérol. La condition essentielle étant cependant que les stérols de la levure puissent être séparés quantitativement des autres substances présentant une possibilité d'absorption dans la zone considérée.

c) *Procédés chromatographiques*

Ces méthodes offrent de grandes possibilités pour l'identification et la séparation des stérols de la levure. En particulier elles ont permis de réaliser les études du métabolisme avec des traceurs radioactifs.

On peut utiliser, comme l'ont fait DAUBEN et *al.* (1962), KRITCHEVSKY et KIRK

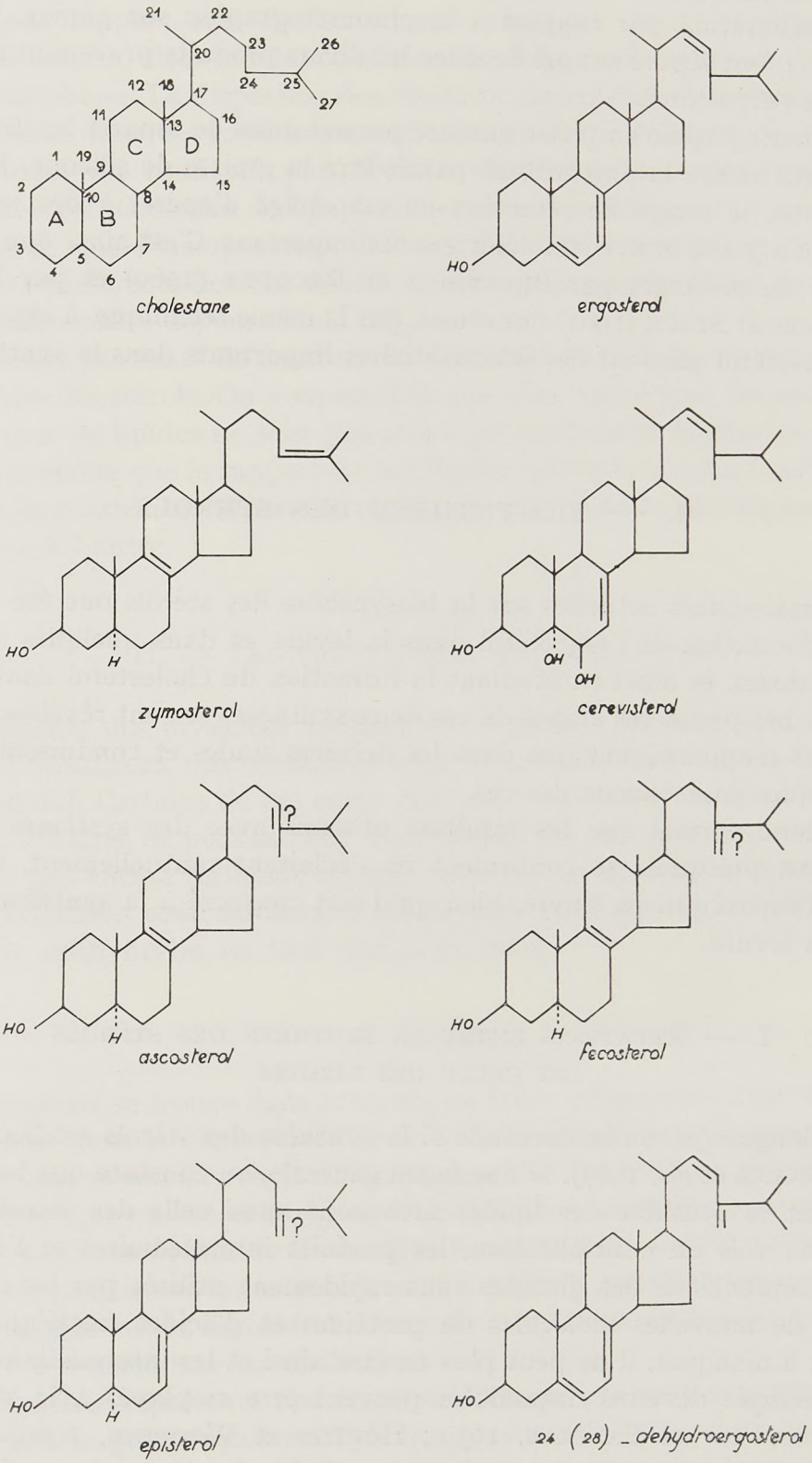


FIG. 1. — *Formules de quelques stérols de la levure*

(1952), la chromatographie sur papier en phase inversée : papier Whatman n° 1, imprégné de Quilon, développé avec le méthanol. Cette méthode a été expérimentée par les auteurs pour séparer et identifier le squalène et le cholestérol.

La chromatographie sur colonne de silice a été aussi utilisée par Johnston et Bloch (1957) pour séparer squalène, lanostérol, zymostérol et ergostérol et par Norman et de Luca (1963) pour séparer ergostérol, tachystérol et vitamine D_2.

Les techniques de chromatographie sur couche mince de gel de silice représentent une amélioration par rapport à la chromatographie sur papier. Norman et de Luca (1963) ont séparé sur gel de silice les divers produits provenant de la photo-oxydation de l'ergostérol.

La chromatographie en phase gazeuse permet aussi de séparer les divers stérols. La phase stationnaire la plus utilisée paraît être la graisse de silicone. Pour ne pas trop augmenter le temps de rétention on est obligé d'opérer à des températures élevées, jusqu'à 300°C et avec un débit gazeux important. C'est ainsi que l'ergostérol a été séparé de mélanges par Beerthuis et Recourt (1960) et par Nicolaides (1960). Holmes et Stack (1962) ont réussi, par la même technique, à séparer le squalène et le lanostérol qui sont des intermédiaires importants dans la synthèse de l'ergostérol.

C. — BIOSYNTHÈSE DES STEROLS

Nos connaissances actuelles sur la biosynthèse des stérols ont été acquises en étudiant la formation de l'ergostérol dans la levure et dans quelques autres ascomycètes inférieurs, et aussi en étudiant la formation du cholestérol dans le foie des mammifères. Les premières étapes de ces deux synthèses se sont révélées identiques, les différences n'apparaissent que dans les derniers stades et conduisent à des produits spécifiques dans chacun des cas.

Il est donc normal que les résultats obtenus avec des systèmes biologiques très différents, puisqu'ils se confirment et s'éclairent mutuellement, se trouvent mêlés dans l'exposé qui va suivre, bien qu'il soit consacré à la synthèse de l'ergostérol dans la levure.

I. — Relations entre la synthèse des stérols et celle des lipides

Depuis longtemps, on se demande si la synthèse des stérols est liée à celle des lipides (Terroine et *al.*, 1927). D'une façon générale, on constate que les conditions qui favorisent la synthèse des lipides favorisent aussi celle des stérols. Dans les organismes en voie de multiplication, les produits intermédiaires et l'énergie provenant du métabolisme des glucides sont rapidement utilisés par les cellules pour la synthèse de nouvelles molécules de protéines et d'acides nucléiques. Lorsque l'azote vient à manquer, il ne peut plus en être ainsi et les intermédiaires du métabolisme glucidique devenus disponibles peuvent être employés à la synthèse des lipides (Konsansky et Fazekas, 1959 ; Hopton et Woobine, 1960). Lipides et stérols ont un précurseur commun dans la cellule : l'acétate. Lorsqu'on suit son

incorporation par des extraits de levure, on constate qu'elle se fait parallèlement dans la partie saponifiable et dans la partie insaponifiable des lipides (KLEIN, 1960).

La synthèse des lipides, comme celle des stérols, n'est pas liée à la croissance de la culture. Plusieurs expériences rapportées par la suite montrent qu'elle peut se produire aussi chez les cellules non proliférantes.

Dans une espèce déterminée, la proportion des stérols par rapport aux lipides reste constante (HALDEN, 1934). MAGUIGAN et WALKER (1940) donnent 18 p. 100 de stérols par rapport aux lipides comme moyenne de 45 expériences portant sur la même souche, alors que les conditions expérimentales avaient varié de l'aérobiose à l'anaérobiose. La dispersion des résultats autour de la moyenne pour les deux espèces utilisées dans ces expériences est très faible. Le résultat de MAGUIGAN et WALKER (1940) est confirmé par NYMAN et CHARGAFF (1949) qui ont trouvé 19 p. 100 pour les particules de lipoprotéines extraites de la levure. Cependant KLEIN (1957) observe que l'incorporation de l'acétate dans l'homogénat de levure peut être effectuée préférentiellement dans la partie non saponifiable lorsque l'incubation se fait en atmosphère dépourvue de CO_2.

Il ne serait pas exact de conclure à un parallélisme absolu entre la synthèse des lipides et celle des stérols. On a vu en effet que, chez les levures, les souches qui produisent le plus de lipides ne sont pas celles qui produisent le plus de stérols. Il est donc vraisemblable que le rapport stérols/lipides qui reste constant malgré les variations du milieu extérieur se trouve réglé par des facteurs génétiques qui varient d'une espèce à l'autre.

II. — Les précurseurs de l'ergostérol

L'utilisation des molécules radioactives a permis de mettre en évidence dans la levure de nombreux intermédiaires de la biosynthèse entre le stade acétate et le stade ergostérol. Certains de ces corps peuvent s'accumuler en quantité importante (squalène), d'autres ne peuvent être décelés que par leur radioactivité et leur séparation n'est pas encore terminée «height counting companions». Certaines étapes de ces transformations sont aérobies, d'autres sont anaérobies et nécessitent même la présence de sulfhydryles en tant que réducteurs.

a) *Lanostérol*

Le lanostérol se trouve dans la levure en faible proportion, c'est un des derniers intermédiaires dans la chaîne des réactions qui conduit au zymostérol et à l'ergostérol (KODICEK et ASBHY, 1957). On a pu montrer que c'est un précurseur commun aux stérols en C_{27} zymostérol et C_{28} ergostérol. Cette transformation peut être réalisée facilement par l'homogénat de levure (SCHWENK et ALEXANDER, 1958). On constate que cet intermédiaire se forme rapidement lorsque le squalène accumulé en anaérobiose est transformé en ergostérol. Dans des conditions analogues, l'homogénat de foie de rat le transforme en cholestérol.

Le lanostérol représente une étape importante car c'est à ce stade que se fait l'introduction du groupement méthyle qui constitue le carbone 28 dans la structure de l'ergostérol (KODICEK et ASHBY, 1957). On sait que cet atome de carbone n'a

pas la même origine que les autres, qu'il ne provient ni de l'acide acétique (Hanahan et Wakil, 1953) ni de l'acide propionique (Alexander, Gold et Schwenk, 1957 et 1958). On sait en outre que cet atome de carbone est introduit après cyclisation du squalène puisque le carbure aliphatique correspondant, le méthylsqualène, n'a pas été trouvé dans la levure.

Les préparations de levures dépourvues de cellules sont capables d'incorporer dans l'ergostérol, outre l'acétate et le formiate, la sérine et surtout la méthionine (Alexander, Gold et Schwenk, 1958). La méthionine est d'abord incorporée dans les composés de la fraction non saponifiable et passe ensuite dans l'ergostérol. En utilisant la méthionine marquée sur le groupement méthyle, toute la radioactivité se retrouve dans le carbone 28 de l'ergostérol. Le mécanisme de cette transméthylation a été précisé et il s'agit du transfert d'un groupe méthyle d'un atome de S à un atome de C (Alexander et Schwenk, 1958).

L'incubation avec de la méthionine radioactive ne provoque pas l'apparition de zymostérol ou de lanostérol marqués. Si le carbone 28 provient pour la plus grande part de la méthionine, on peut s'attendre à trouver une quantité réduite d'ergostérol chez les mutants qui ne réalisent plus la synthèse de cet acide aminé. Le zymostérol devrait être le principal stérol trouvé dans ces levures. A notre connaissance aucune recherche dans ce sens n'a encore été entreprise.

b) *Squalène*

La présence de squalène dans la fraction non saponifiable de la levure a été établie par Täufel, Heinisch et Heimann (1940). Dans la nature, le squalène accompagne souvent les stérols, c'est ainsi qu'il a été décelé dans le résidu du raffinage de l'huile d'olive (Marcelet, 1936), dans le foie des poissons (Chapmann, 1917) ou des mammifères (Bucher, 1958). Le squalène peut donc être considéré avec quelque vraisemblance comme un précurseur commun aux stérols d'origine végétale et à ceux d'origine animale.

Il n'est pas incorporé par les cellules de levure non proliférantes, vraisemblablement parce qu'il ne peut y pénétrer à cause de son insolubilité et cela malgré la présence d'agents dispersants. Il est possible qu'il en soit autrement avec des cellules en voie de croissance, puisqu'elles sont susceptibles d'incorporer et d'utiliser pour leur croissance les alkanes.

Le squalène se trouve surtout dans les levures cultivées en anaérobiose. Dans ces conditions, il s'accumule dans la cellule, puisqu'il ne peut être transformé en stérol qu'en aérobiose, et s'y trouve en quantité 10 fois plus grande que l'ergostérol (Klein, 1955 ; Popjak et *al.*, 1958). Dans des cellules non proliférantes, aérées en présence de glucose, le squalène qui représente 66 p. 100 de l'insaponifiable au début de l'expérience n'en représente plus que 21 p. 100 après 2 heures et 8 p. 100 après 24 heures.

Le squalène radioactif est transformé en ergostérol radioactif par l'homogénat de levure (Schwenk et Alexander, 1958). Le rendement de la transformation du squalène exogène est faible : cela peut provenir de ce que le système enzymatique est loin d'être saturé par le substrat insoluble dans l'eau. Le squalène qui n'est pas incorporé dans les stérols reste inchangé dans le milieu, il ne subit donc aucune dégradation.

Le passage du squalène au lanostérol nécessite des cyclisations, qui sont réalisées

par un système enzymatique (squalène oxydocyclase) complexe et peu connu, qui a été extrait du foie de porc (Tchen et Bloch, 1957). Ce système, porté par des particules, fonctionne en présence d'oxygène, il nécessite la présence des métaux divalents et il est accéléré par le DPN ou le TPN. Lorsque les particules ont été dialysées, l'addition d'un système générateur de $TPNH^+$ est indispensable pour réactiver la préparation.

Avec des préparations obtenues à partir du foie de rat, la transformation du squalène peut aller jusqu'au stade cholestérol (Tchen et Bloch, 1957 ; Goodman, 1961). Le système présente alors des exigences supplémentaires, soit l'addition d'un composé à fonction thiol (glutathion ou cystéine), soit la présence simultanée d'acide éthylène diamine tétracétique et d'acide ascorbique. Cette préparation présente un optimum d'activité étroit situé à pH 7,5.

c) *Acide mévalonique*

L'attention a été attirée sur ce composé en tant que facteur susceptible de remplacer l'acétate pour activer le développement de certains ferments lactiques (Skeggs et *al.*, 1956 ; Tamura et Folkers, 1958). Isolé d'abord des résidus de distillerie, sa composition a été confirmée par la synthèse chimique (Wolf et *al.*, 1956) et biochimique (Henning, Moslein et Lynen, 1959).

L'acide, la lactone ou l'aldéhyde correspondant (aldéhyde mévaldique) se sont montrés susceptibles d'être incorporés rapidement dans les composés à structure isoprène ou ceux qui en dérivent (stérols). Lorsque le système synthétisant les stérols se trouve en présence d'acétate radioactif et de mévalonate, on observe une diminution de l'activité spécifique des stérols ce qui indique que le mévalonate est incorporé concurremment à l'acétate et même d'une façon préférentielle. Avec le foie de rat, il a été possible de préciser que 87 p. 100 des stérols formés pouvaient provenir du mévalonate introduit (Tavormina, Gibbs et Huff, 1956).

La transformation du mévalonate en squalène nécessite un composé à SH, vraisemblablement le coenzyme A qui est présent sur les microsomes du foie de rat. Lorsque la réaction est faite en présence d'air, il est indispensable, pour qu'elle s'arrête au stade squalène, de constituer un milieu réducteur en ajoutant du glutathion ou de l'acide ascorbique. Si les réducteurs font défaut, il y a production de cholestérol.

Des réactions analogues se produisent chez la levure. Le mévalonate doit subir un certain nombre de transformations enzymatiques pour donner les structures isoprènes. Les enzymes responsables ont été reconnus puis séparés et partiellement purifiés à partir de l'autolysat de levure. Les trois premiers sont facilement solubilisés. Il s'agit de :

1°) La kinase de l'acide mévalonique qui utilise l'ATP et nécessite la présence d'ions divalents (Bloch et *al.*, 1959).

2°) La kinase de l'acide phosphomévalonique.

3°) La décarboxylase de l'acide pyrophosphomévalonique. On sait en effet que le carboxyle du mévalonate n'est pas incorporé dans le squalène. En outre, le carbone du groupement méthyle du mévalonate ne se retrouve pas parmi les groupements méthyle angulaire du squalène (Tchen, 1958). La décarboxylase conduit à l'isopentényl pyrophosphate.

4°) Le quatrième enzyme n'a pas été très étudié, c'est une isomérase (isopentényl pyrophosphate isomérase) qui fait apparaître la structure isoprène dans la molécule. Le produit de la réaction est le diméthylallyl pyrophosphate : cette isomérisation nécessite la présence de glutathion (AGRANOFF et *al.*, 1960).

Les intermédiaires présentant la structure allylique (diméthylallyl, géranyl, farnésyl) ne peuvent être incorporés dans le squalène que s'ils sont sous la forme de pyrophosphate. Les liaisons pyrophosphates sont synthétisées à partir de l'acide mévalonique et de l'ATP par deux kinases. Dans le foie, CHRISTOPHE et POPJAK (1960) ont montré que ces esters pyrophosphoriques pouvaient aussi être hydrolysés et, par action de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénase, donner les acides correspondants (acides prénoïques). Dans des expériences d'incorporation de mévalonate, 40 p. 100 peuvent subir cette transformation et devenir ainsi inutilisables dans la synthèse des stérols.

d) *Acétate*

L'acétate est un bon précurseur des lipides et des stérols de la levure alors qu'on ne le retrouve presque pas dans les hydrates de carbone (SONDERHOFF et THOMAS, 1937). Son incorporation a été mise en évidence en utilisant des molécules marquées. Cependant plusieurs auteurs ont reconnu que l'acétate ne suffisait pas toujours comme substrat pour assurer la lipogénèse chez la levure (MAGUIGAN et WALKER, 1940) ou chez *Trichosporon* (KLEMM, 1961).

On sait qu'il existe de grandes différences chez les levures dans les possibilités d'utiliser l'acétate ; c'est ainsi que certaines souches peuvent être adaptées à ce substrat, alors que les cellules provenant d'une culture anaérobie ont besoin d'une période d'induction des enzymes respiratoires avant de pouvoir l'utiliser. A condition que les cellules possèdent une autre source d'énergie, l'acétate peut constituer la seule source de carbone utilisée dans la synthèse de l'ergostérol par la levure ou par *Neurospora* (HANAHAN et WAKIL, 1952 ; OTTKE et *al.*, 1951).

L'incorporation de l'acétate dans les stérols peut être réalisée par des préparations dépourvues de cellules. Dans ces conditions, la synthèse de l'ergostérol est maximum après 48 heures d'incubation. Le rendement avec un extrait non fractionné atteint à peine 2 à 3 p. 100 par suite de l'accumulation de nombreux intermédiaires et de lipides saponifiables. D'après SCHWENK et ALEXANDER (1958), l'incorporation de l'acétate fait intervenir les cofacteurs suivants : ATP, DNP, ou TPN, Co A et Mg^{++}. La méthionine est indispensable pour parvenir jusqu'au stade ergostérol (JOHNSTON, 1961).

Les extraits capables d'incorporer l'acétate dans les stérols présentent des exigences en cofacteurs très différentes suivant leur mode de préparation et de purification. C'est ainsi qu'avec un extrait brut, CORWIN, SCHROEDER et Mac CULLOUGH (1956) obtiennent l'incorporation sans ajouter de cofacteur. Lorsque le même extrait est dialysé, il faut ajouter du coenzyme A. Avec les préparations obtenues par KLEIN et BOOHER (1956) il est indispensable d'ajouter de l'ATP.

La partie soluble de l'extrait de levure suffit pour la synthèse du squalène à partir de l'acétate, pourvu qu'on ajoute le $TPNH^+$ nécessaire (KLEIN, 1960). Ce résultat est analogue à celui obtenu avec le foie de rat (POPJAK et *al.*, 1958). Dans la synthèse *in vivo*, les enzymes des particules participent à cette incorporation en fournissant le $TPNH^+$ indispensable.

Lorsqu'on utilise de l'acétate marqué sur le C du groupement méthyle et de l'acétate marqué sur le C du groupement carboxyle, on constate que les extraits de levure incorporent de préférence le C des méthyles plutôt que le C des carboxyles. C'est ainsi que dans les stérols insolubilisés sous forme de digitonide, le rapport $\frac{\text{C méthyle}}{\text{C carboxyle}} = 1{,}82$ (JOHNSTON, 1961). Ce résultat diffère de celui obtenu pour la synthèse du cholestérol par le foie de rat où le rapport est de 1,25 (LITTLE et BLOCH, 1950). On sait, par exemple, que dans la chaîne latérale de l'ergostérol, les carbones 23 et 25 proviennent des méthyles de l'acétate (HANAHAN et WAKIL, 1953) alors que dans le cholestérol les carbones 20, 23 et 25 proviennent du carbonyle de l'acétate (WÜERSCH, HUANG et BLOCH, 1952).

L'incorporation de l'acétate peut être inhibée par la streptomycine et les protamines qui agissent aux mêmes concentrations moléculaires. Cette inhibition ne paraît pas provenir de la précipitation des acides nucléiques présents dans l'extrait. Il est d'ailleurs peu vraisemblable qu'ils jouent un rôle dans cette synthèse puisque les particules qui la réalisent conservent leur activité après un traitement par une ribonucléase (KLEIN, 1960). L'incorporation du carboxyle de l'acétate est plus inhibée par la streptomycine que celle du méthyle (JOHNSTON, 1961).

e) *Autres précurseurs*

La synthèse des stérols fait apparaître d'autres intermédiaires dont les conditions de synthèse ne sont pas encore précisées. Plusieurs d'entre eux ont été indiqués dans la figure 2 et permettent de suivre les diverses étapes d'édification de la molécule.

f) *Interconversion des stérols*

Les organismes présentent une certaine spécialisation dans le type de stérol synthétisé. La levure forme surtout de l'ergostérol (C_{28}) qui est accompagné en plus faible proportion par le zymostérol (C_{27}). Le zymostérol ne peut être converti en ergostérol alors que le cholestérol d'origine exogène peut être transformé en ergostérol par l'action d'homogénat de levure (SCHWENK et ALEXANDER, 1958). Cependant le zymostérol et le lanostérol peuvent être convertis en cholestérol par le foie des animaux avec des vitesses à peu près identiques (JOHNSTON et BLOCH, 1957) (SCHWENK et ALEXANDER, 1958).

III. — RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES STÉROLS

a) *Les stérols comme facteurs de croissance*

L'absence de stérols dans les cellules bactériennes paraît maintenant bien établie et constitue un critère de différenciation entre bactéries et champignons inférieurs. Les résultats différents qui ont été rapportés par certains auteurs sont dus vraisemblablement à la fixation sur la paroi cellulaire de stérols présents dans le milieu de culture (HARTMAN et HOLMLUND, 1962).

Les stérols se sont révélés comme des facteurs de croissance indispensables pour certains organismes parasites comme les protozoaires et les P. P. L. O. Pour les

levures, les stérols deviennent indispensables lorsqu'elles se trouvent en anaérobiose, c'est-à-dire dans des conditions où elles sont incapables de réaliser leur synthèse (ANDREASON et STIER, 1953). Ce besoin est satisfait aussi bien par le cholestérol que par l'ergostérol, puisque la levure est capable de les convertir l'un en l'autre. Le calciférol et l'acide cholique ne peuvent cependant remplacer l'ergostérol (ANDREA-

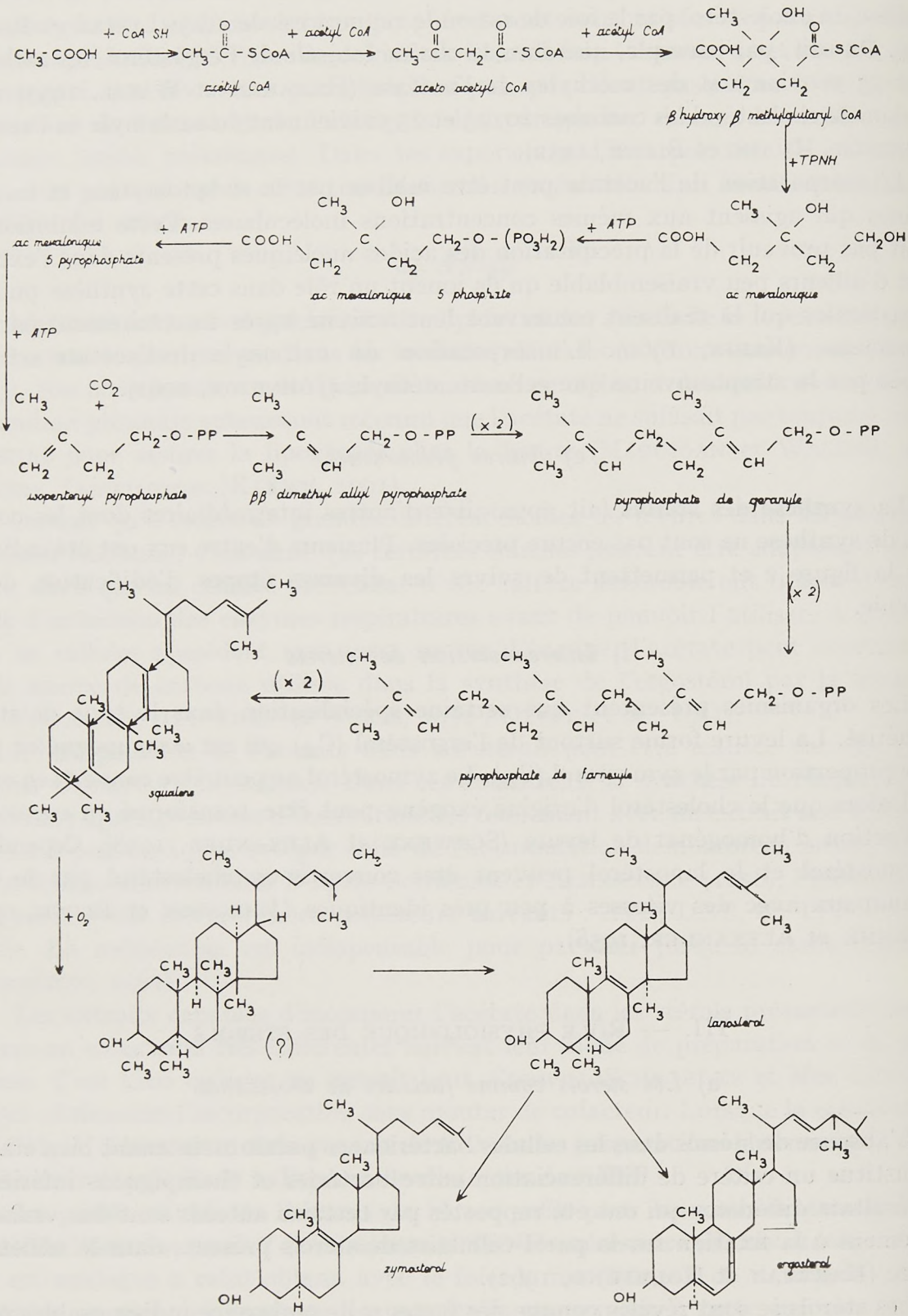


FIG. 2. — *Schéma de la biosynthèse de l'ergostérol*

son et Stier, 1954). Les stérols peuvent aussi se révéler indispensables pour permettre la croissance des levures à 40°C, parce que leur synthèse est fortement réprimée à cette température (Starr et Parks, 1962).

Comme les lipides, les stérols peuvent avoir un rôle de réserve ou de déchet et aussi un rôle de facteur indispensable à la croissance. Malheureusement on sait encore trop peu de choses sur le rôle physiologique des stérols dans la levure, et ce qui va suivre ne peut être considéré que comme une tentative d'explication.

Des efforts infructueux ont été faits par Adelberg et *al.* (1955) en vue d'induire des mutants exigeant la présence de stéroïdes comme facteur de croissance. Il est normal que les essais entrepris avec *E. coli* n'aient eu aucun succès puisque les bactéries n'utilisent pas les stérols dans leur métabolisme. Ceux entrepris avec *S. cerevisiae* ont conduit à des souches qui présentent une exigence temporaire en stérols. On a constaté qu'elle correspondait à une déficience en ergostérol. Dans aucune des souches ainsi sélectionnées cette exigence n'a persisté après le troisième repiquage.

Puisque les stérols sont parmi les constituants constants des diverses espèces de levure, puisqu'ils peuvent être indispensables dans certains cas, on peut supposer qu'ils ont un rôle dans l'économie générale de la cellule. Si la prèsence d'ergostérol ne conférait pas un avantage aux cellules qui en sont pourvu au cours de l'évolution, on aurait dû assister, par suite de mutation atteignant cette fonction, à la formption d'un groupe sans stérol. Un tel groupe a dû être défavorisé et éliminé. par la sélection naturelle, puisqu'il n'apparaît pas.

b) *Stérols des particules*

Aucune expérimentation n'a été réalisée à notre connaissance pour établir un parallèle entre l'accumulation des lipides et des stérols, et l'adaptation respiratoire. On sait que l'aération provoque l'apparition des enzymes respiratoires (catalase, cytochrome peroxydase...) même dans les cellules qui sont incapables d'utiliser l'oxygène. On sait aussi que dans les mêmes conditions, l'aération provoque la synthèse de stérols même dans les souches déficientes respiratoires. Or on a remarqué que les enzymes ayant un rapport direct avec la respiration sont associés à des particules (Nossal, 1954). Ce sont précisément ces particules qui contiennent la plus grande partie des lipides et des stérols présents dans la levure. On peut donc supposer que l'ergostérol serait indispensable à l'édification de ces structures, qui maintiennent les enzymes à l'état insoluble et étroitement associés les uns aux autres.

c) *Stérols de la membrane*

Les antibiotiques à polyène (nystatine, amphotéricine B, filipine) sont efficaces sur *Neurospora* en altérant la perméabilité de la membrane (Kinsky, 1961). Cette action se traduit par une perte de poids du mycélium et une libération dans le milieu des constituants cellulaires. Les mêmes phénomènes s'observent aussi chez *S. cerevisae* (Marini, Arnow et Lampen, 1961). Ils paraissent provoqués par la combinaison de ces antibiotiques avec les stérols qui sont présents dans la membrane. Cette réaction paraît être de nature purement physicochimique, puisqu'elle peut se produire en l'absence de matière vivante. La combinaison ainsi réalisée endommage la membrane et change sa perméabilité d'une façon irréversible.

En utilisant les diverses fractions d'un homogénat de levure, on observe une bonne corrélation entre leur teneur en stérol et la quantité de nystatine qu'elles peuvent fixer. Avec les cellules entières les choses se présentent d'une autre façon par suite de l'existence de catégories de stérols diversement accessibles. Il n'est donc pas surprenant de ne pas trouver de différence, pour la sensibilité à la nystatine, entre les souches de levures ayant une forte teneur en stérol et les autres. C'est ainsi que des cellules, dont la teneur en stérol varie de 1 à 10, fixent cependant la même quantité de nystatine (LAMPEN, ARNOW et SAFFERMAN, 1960).

Ces faits peuvent suggérer que les stérols jouent un rôle important pour assurer la perméabilité de la membrane des levures et qu'ils sont peut-être irremplaçables dans cette fonction. Les stérols indispensables à cette structure peuvent ne représenter qu'une faible proportion de ceux présents dans la cellule.

D. — INFLUENCE DES CONDITIONS DU MILIEU SUR LA SYNTHÈSE DE L'ERGOSTEROL

De nombreux travaux ont été consacrés à étudier l'influence que les conditions extérieures peuvent exercer sur la production des stérols par les levures. Les uns ont eu pour objet d'acquérir de nouvelles connaissances en physiologie microbienne et, pour ce faire, on a comparé des teneurs en stérols rapportées aux poids secs ou encore l'activité spécifique des stérols formés dans les expériences où des précurseurs radioactifs ont été utilisés. D'autres travaux ont été réalisés dans un but pratique en vue d'améliorer les conditions de production industrielle de l'ergostérol. L'ergostérol irradié constitue, en effet, la source de vitamine D la plus importante pour l'industrie pharmaceutique. Dans ce cas, la teneur des levures en stérol n'est plus le seul résultat intéressant, il faut aussi tenir compte du rendement et de la vitesse de croissance. Le rendement industriel peut être assez bien représenté par la quantité de stérol synthétisée par litre de milieu de culture, c'est pourquoi plusieurs auteurs ont choisi d'exprimer ainsi leurs résultats.

I. — ALIMENTATION CARBONÉE

Les premières recherches sur ce sujet sont dues à PRICKETT et *al.* (1930), puis MASSENGALE, BILLS et PRICKETT (1931). Elles ont été faites avec des levures en croissance et ont conduit à la conclusion que la concentration du sucre dans le milieu de culture est le facteur principal conditionnant la teneur des levures en ergostérol. C'est à tort qu'on avait conclu de cette observation que l'ergostérol devait être un produit primaire du métabolisme des hydrates de carbone. On a observé, depuis, que sa synthèse continue encore dans la levure alors que les glucides sont déjà épuisés dans le milieu (GAL'TSOVA, NOVICHKOVA et VAKINA, 1959). Ceci s'explique soit par la transformation des réserves internes des cellules, soit par l'utilisation de l'éthanol qui a pu s'accumuler dans le milieu de culture. Lorsque la teneur en glucose passe de 2 à 10 p. 100, la teneur en ergostérol dans les levures

double et peut même tripler pour les souches ayant normalement une teneur assez faible. DULANEY, STAPLEY et SIMPF (1954) indiquent que l'aliment carboné peut être apporté industriellement par du sirop de maltose et d'une façon plus économique par la mélasse. STARR et PARKS (1962) ont comparé l'efficacité de divers substrats pour l'accumulation de stérols par les levures en croissance. On trouve dans un ordre de moindre efficacité : l'acétate, l'éthanol, le glucose, le maltose, le glycérol, le xylose et le succinate. Pour *Saccharomyces carlsbergensis* après 24 h de culture, MASSENGALE, BILLS et PRICKETT (1931) ont observé les plus fortes teneurs en stérol, lorsque le milieu contient raffinose, saccharose ou maltose. Les autres sucres donnent des teneurs plus faibles, aussi bien ceux qui permettent la croissance : galactose, mannose, fructose, glucose, que ceux qui ne sont pas assimilés : xylose, lactose, mellibiose...

Puisque les lipides et les stérols peuvent être synthétisés sans qu'il se produise de multiplication cellulaire, on s'est efforcé de déterminer les substrats carbonés les plus efficaces pour leur formation. Ces études ont été faites avec des levures non proliférantes provenant de cultures pures, ou encore avec des levures industrielles.

a) *L'acétate* peut être utilisé pour la synthèse des stérols par la levure à condition que le milieu soit voisin de la neutralité (MAC LEOD et SMEDLEY-MAC LEAN, 1938 ; WHITE et WERKMAN, 1948). Cependant, d'autres auteurs constatent que l'acétate est inutilisable par la levure lorsqu'il constitue la seule source de carbone du milieu, ainsi MAGUIGAN et WALKER (1940) avec *Saccharomyces cerevisiae*, KLEMM (1961) avec *Trichosporon pullulans*. Au contraire lorsqu'il est associé au saccharose, il augmente la synthèse des stérols (STARR et PARKS, 1962). KLEIN (1955) a précisé que l'acétate nécessite, pour être utilisé par la levure, une adaptation des cellules qui demande de 18 à 24 heures.

b) *L'éthanol* est aussi utilisable par la levure pour la synthèse des stérols (MAC LEOD et SMEDLEY-MAC LEAN, 1938 ; PARKS, STARR et TURNER, 1962 ; STARR et PARKS, 1962). Vraisemblablement, il n'est incorporé qu'après transformation en acétate. L'une des méthodes les plus anciennement utilisées pour augmenter la synthèse des stérols par la levure consiste à laisser des levures en pâte en présence de vapeurs d'alcool et avec une aération ménagée (HALDEN, 1934 ; SOBOTKA, HALDEN et BILGER, 1935). Dans ces conditions, la synthèse peut se poursuivre pendant 30 jours et atteindre une teneur en stérol voisine de 10 p. 100.

c) *Le glucose* est un bon substrat pour la synthèse des stérols. KLEIN (1955) a trouvé qu'il était utilisable dans un milieu dépourvu d'azote, c'est-à-dire dans des conditions où les cellules ne peuvent pas se multiplier. Dans les expériences de PARKS, STARR et TURNER (1962) et de STARR et PARKS (1962) il est utilisé par les levures non proliférantes et leur teneur en stérol augmente en même temps que la concentration en glucose dans le milieu.

d) *Le succinate et le glycérol* paraissent inutilisables pour des cellules non proliférantes (STARR et PARKS, 1962). Il faut cependant signaler que l'incubation des levures en présence de phosphate et de glycérol a été brevetée par ZORKÓCZY (1939) comme un moyen pour accroître leur teneur en ergostérol.

II. — Alimentation azotée

Il semble bien exister dans la levure un antagonisme entre la formation des protéines et celle des lipides et des stérols. Les levures riches en protéines sont habituellement pauvres en stérols, aussi, toutes les conditions de milieu qui limitent la synthèse protéique produisent en général des cellules riches en stérols.

La limitation de l'azote disponible dans le milieu de culture constitue le moyen le plus simple de freiner la synthèse protéique et par conséquence, d'augmenter la teneur des cellules en ergostérol. C'est la raison pour laquelle un produit pauvre en azote assimilable, tel que la mélasse, constitue un bon milieu nutritif pour la production de levures riches en stérol. Dulaney, Stapley et Simpf (1954), en se plaçant à un point de vue industriel, ont déterminé quelles étaient les additions les plus efficaces à faire à un milieu à base de mélasse, pour obtenir les meilleurs rendements en stérol. En déterminant après 3 et 7 jours la teneur en stérol des cellules contenues dans 100 ml de milieu, ces auteurs ont trouvé que le « corn steep », à la dose de 2 p. 100, était le seul aliment azoté produisant une nette augmentation de la synthèse de stérols.

Dans un milieu différent, Gal'tsova, Novichkova et Vakina (1959) ont trouvé que l'addition de sulfate d'ammonium, d'hydrolysat de caséine ou de glycine se traduit par la production de cellules moins riches en stérols.

III. — Aération

On a constaté que l'oxygène est indispensable à la synthèse des stérols par la levure. On sait qu'il intervient pour la cyclisation du squalène. Lorsque les levures sont cultivées en anaérobiose stricte (Klein, 1955), la teneur en stérol varie de 1,1 à 1,7 mg/g. Il n'est cependant pas certain que ces faibles quantités aient été synthétisées au cours de la croissance en anaérobiose, on peut penser qu'il s'agit seulement des stérols qui ont été introduits par l'ensemencement.

Les levures cultivées en aérobiose contiennent environ dix fois plus de stérols que celles cultivées sur le même milieu en anaérobiose. Ceci est vrai même pour un mutant déficient respiratoire (Klein, 1955) qui réagit à l'aération par la synthèse de stérols bien qu'il soit incapable de consommer l'oxygène qui est mis à sa disposition.

Les cellules cultivées en anaérobiose contiennent des quantités importantes d'hydrocarbures, principalement de squalène, qui après 8 heures d'aération sont presque entièrement transformés en stérols (Klein, 1955).

Konsanszky (1960) a recherché la relation qui pouvait exister entre le potentiel d'oxydoréduction du milieu et la synthèse des stérols. Bien que le potentiel d'oxydoréduction puisse, dans certaines conditions, varier parallèlement à la tension de l'oxygène dissous, l'interprétation des résultats est sérieusement compliquée par l'emploi des composés chimiques ajoutés au milieu de culture pour faire varier le potentiel. En utilisant l'acide thioglycolique, l'aneurine et la chlorophylle, on a obtenu des différences importantes dans les potentiels et cependant les variations en ergostérol sont restées inférieures à 20 p. 100.

Des expériences susceptibles de préciser la relation existant entre l'oxygène dissous dans le milieu de culture et la synthèse des stérols n'ont pas encore été faites à notre connaissance. Elles pourraient apporter des résultats nouveaux, puisqu'il paraît probable que l'oxygène intervient dans cette synthèse par une voie différente de celle des cytochromes normalement utilisée dans la respiration.

Plusieurs auteurs ont pensé que les substances qui augmentent l'activité respiratoire de la levure pourraient aussi favoriser la synthèse des stérols. HUTTERER (1953) a constaté, en effet, que l'addition d'hémine au milieu de culture peut doubler la teneur en ergostérol de la levure, après 6 heures de culture. KONSANSZKY et FAZEKAS (1959) observent que la chlorophylle, à la dose de 200 mg/l, peut augmenter de 40 p. 100 la teneur en stérol, en même temps que la substance sèche produite.

IV. — TENEUR DES CELLULES EN Co A

Depuis le travail de KLEIN et LIPMANN (1953), on sait que la synthèse des stérols et des lipides est d'autant plus faible que les cellules sont moins riches en CoA. En faisant varier la teneur du milieu en pantothénate, ces auteurs ont réussi à produire des levures déficientes en Co A qui se sont révélées faibles productrices de stérol. La réciproque est aussi vraie, comme le montre l'expérience de HANAHAN et WAKIL (1952) qui a consisté à enrichir les levures en Co A au cours de leur croissance. Lorsqu'on les aère ensuite pendant 16 heures en présence d'acétate, la teneur en stérol est augmentée de 4 fois chez les levures les plus riches en Co A.

On a donc cherché un moyen d'augmenter la teneur en Co A des levures. RAJAGOPALAN et SARMA (1958) sont parvenus, en cultivant les levures en présence de sulfanilamide, à augmenter de 2,6 fois leur teneur en Co A et de 3,2 fois leur teneur en stérol. On peut penser que la teneur élevée en Co A est en rapport avec la toxicité de la sulfanilamide et son mode d'élimination de la cellule. Dans cette expérience, l'augmentation de la teneur en stérol se produit en même temps qu'une diminution de la croissance et il semble que les deux phénomènes soient liés. En effet, STARR et PARKS (1962) n'obtiennent aucune augmentation du rendement en stérol après avoir ajouté des concentrations croissantes de sulfanilamide à des levures non proliférantes, agitées pendant 10 heures, en présence de glucose. Pour prouver la validité de leur expérience, ils ont montré que, dans ces conditions, la sulfanilamide ne produit aucune inhibition de la synthèse des stérols. On peut donc penser que ce produit, en ralentissant la croissance, permet aux cellules de consacrer une part plus importante des glucides métabolisés à la synthèse des lipides.

V. — LES COMPÉTITEURS DES STÉROLS

On sait que les stérols de la membrane sont les sites sur lesquels viennent se fixer les antibiotiques à structure polyène. Ces antibiotiques sont particulièrement efficaces vis-à-vis des levures dont la croissance est inhibée par des doses allant de 2 à 5 mg/l. Comme l'ont montré PICHAPPA et *al.* (1962), les levures cultivées en présence de 1,5-2 mg/l de nystatine accroissent leur production de stérols. C'est là une réaction de défense du microorganisme puisqu'elle tend à faire diminuer la teneur

en inhibiteur présent dans le milieu de culture. A la suite de ces observations, on aurait pu croire que les souches de levures les plus résistantes à ces antibiotiques devraient être aussi les plus riches en stérols. L'expérience de LAMPEN et *al.* (1962) n'a pas confirmé ce point de vue, vraisemblablement parce que la proportion d'ergostérol présent sur la membrane de la levure et se combinant à l'antibiotique est faible par rapport à la teneur totale de la cellule.

VI. — L'IRRADIATION

L'irradiation des animaux supérieurs produit une augmentation de la teneur en cholestérol du plasma sanguin. Ceci n'est pas tellement dû à une mobilisation des réserves à la suite d'une réaction neuro-endocrinienne, mais surtout à une synthèse accrue qui peut être mise en évidence par la mesure de la vitesse d'incorporation de l'acétate marqué. Cette activation de la synthèse à la suite de l'irradiation n'est pas limitée aux stérols, elle peut intéresser à différents degrés les divers lipides de l'organisme. BUCHER (1958) a montré que la conversion de l'acétate en squalène et stérols était augmentée par l'irradiation de préparations de foie de rat dépourvues de cellules. L'irradiation est assez peu active sur la conversion de l'acide mévalonique et du squalène en stérols. Les différences observées sont produites par l'irradiation des microsomes et intéressent les étapes de la synthèse des stérols comprises entre l'acide acétique et l'acide mévalonique.

Chez la levure l'irradiation produit, peut-être pour les mêmes raisons, une augmentation du taux des stérols et des lipides. D'après un rapport de MEISSEL (1955) concernant les travaux soviétiques sur cette question, la synthèse de l'ergostérol peut doubler dans une culture de levures irradiées à 80 krad (GAL'TSOVA et VAKINA, 1957). Cette modification n'est pas due à un changement génétique. Elle intéresse toutes les cellules et se produit pour des doses d'irradiation assez faibles qui retardent seulement le développement de la culture.

Cependant pour SOKUROVA (1958) il serait possible, après irradiation des levures à des doses sublétales, d'obtenir des lignées présentant un accroissement héréditairement fixé de la teneur en ergostérol. Ce caractère disparaît graduellement au cours des subcultures à moins que l'on ne répète l'irradiation. Jusqu'ici ce caractère n'a pu être mis en rapport avec aucune autre particularité de la souche ; en particulier la teneur en ergostérol n'est pas liée à la radiorésistance de la culture.

L'enrichissement des levures en stérol peut aussi être obtenu en ajoutant au milieu de culture des composés chimiques qui simulent les effets biologiques des radiations ionisantes. MEDVEDEVA (1962) signale que le chloréthylamine (embichine en russe) augmente les teneurs en lipides et en stérols de la levure, lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture et même lorsque les cellules sont mises en contact avec ce produit sans qu'il y ait multiplication.

Reçu pour publication en février 1964

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADELBERG E. A., ROSLANSKY P. F., MYERS J. W., COUGHLIN C. A., 1955. Attempted induction of microbial mutants requiring steroidal growth factors. *J. Bact.*, **69**, 733.

AGRANOFF B. W., EGGERER H., HENNING U., LYNEN F., 1960. Isopentenyl pyrophosphate isomerase. *J. Biol. Chem.*, **235**, 326.

ALEXANDER G. J., GOLD A. M., SCHWENK E., 1957 a. The methyl group of methionine as a source of C_{28} in ergosterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2967.

ALEXANDER G. J., GOLD A. M., SCHWENK E., 1957 b. Transfer of the methylgroup of methionine to C_{24} of ergosterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4554.

ALEXANDER G. J., GOLD A. M., SCHWENK E., 1958c. Biogenesis of yeast sterols. II. Origin of carbon-28 of ergosterol. *J. Biol. Chem.*, **232**, 599-609.

ALEXANDER G. J., SCHWENK E., 1958. Biogenesis of yeast sterols. IV. Transmethylation in ergosterol synthesis. *J. Biol. Chem.*, **232**, 611-616.

ALT G. H., BARTON D. H. R., 1952. The constitution of cerevisterol. *Chem. Ind.*, **45**, 1103.

ANDREASON A. A., STIER T. J. B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **41**, 23-36.

ANDREASON A. A., STIER T. J. B., 1954. Anaerobic nutrition of *S. cerevisiae*. II. Unsatured fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **43**, 271-282.

APPLETON G. S., KIEBER R. J., PAYNE W. J., 1955. The sterol content of fungi. II. Screening of representative yeasts and molds for sterol content. *Appl. Microb.*, **3**, 249-251.

BARTON D. H. R., 1945. The application of the method of molecular rotation differences to steroids. I. Naturally occuring sterols and their simple derivatives. *J. Chem. Soc.*, 813-819.

BARTON D. H. R., COX J. D., 1948. The application of the method of molecular rotation differences to steroids. VI. Neosterol. *J. Chem. Soc.*, 1357-1358.

BEERTHUIS R. K., RECOURT J. H., 1960. Sterol analysis by gas chromatography. *Nature*, **186**, 372-374.

BERNHAUER K., PATZELT G., 1935. Uber Schimmel-pilzsterine. I. Die Sterinbildung bei *Aspergillus niger*. *Biochem. Ztschr.*, **280**, 388-393.

BILGER F., HALDEN W., ZACHERL M. K., 1934. Uber die quantitative Bestimmung des Ergosterins und der Gesamtsterine in der Hefe. *Mikrochemie*, **15**, 119-140.

BILLS C. E., MASSENGALE O. N., PRICKETT P. S., 1930. Factors determining the ergosterol content of yeast. I. Species. *J. Biol. Chem.*, **87**, 259-264.

BLOCH K., CHAYKIN S., PHILLIPS A. H., de WAARD A., 1959. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2595.

BREIVIK O. N., OWADES J. L., 1957. Spectrophotometric semimicrodetermination of ergosterol in yeast. *J. Agr. Food Chem.*, **5**, 360-363.

BREIVIK O. N., OWADES J. L., LIGHT R. F., 1954. A new tetraethenoid sterol of yeast. *J. Org. Chem.* **19**, 1734-1740.

BUCHER N. L. R., 1958. Alterations of cholesterol biosynthesis in liver cell fractions from rats in various experimental conditions. *Ciba foundation Symposium, Biosynthesis of Terpens and Sterols*. 46-60.

CALLOW R. K., 1931. Occurence of α-dihydroergosterol as an impurity in yeast ergosterol. *Biochem. J.*, **25**, 87-94.

CASTILLE A., RUPPOL E., 1933. Ergostérol et levures. *Bull. acad. roy. med. Belg.*, **13**, 48-60.

CAVALLITO C. J., 1944. Ergosterol from some species of *Penicillium*. *Science*, **10**, 333.

CHAPMANN A. C., 1917. Spinacene new hydrocarbon from certain fish-liver oils. *J. Chem. Soc.*, **111**, 56-69.

CHRISTOPHE J., POPJAK G., 1960. Biosynthesis of prenoic acids from allylpyrophosphates in liver enzyme systems. *Proc. Intern. Conf. Biochem. Lipids 6th*, Marseille, 287-294.

CORWIN L. M., SCHROEDER L. J., MCCULLOUGH W. G., 1956. Studies on lipid synthesis in cell-free yeast extract. *Federation Proc.*, **15**, 512-513.

DAUBEN W. G., *et al.*, 1952. The regeneration of squalene from its solid hexahydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4321-4323.

DULANEY L. M., STAPLEY E. O., SIMPF K., 1954. Studies on ergosterol production by yeasts. *Appl. Microb.*, **6**, 371-379.

GAL'TSOVA R. D., NOVICHKOVA A. T., VAKINA I. P., 1959. Effects of glucose on ergosterol synthesis by yeasts. *Mikrobiologiya*, **28**, 502-506.

GAL'TSOVA R. D., VAKINA I. P., 1957. Conditions which increase ergosterol biosynthesis by yeast. *Proc. All. Union Sci. Tech. Conf. Appl. Radioactive Isotopes Radiobiol.*, Moscou, 85-89 (English translation).

GOODMAN D. S., 1961. Studies on conversion of squalene to sterol with rat liver enzymes. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2429-2434.

HALDEN W., 1934. Zur Kenntnis des Fett-u. Lipoid stoffwechsel der Hefen, Sterin und Fettanreichung in untergäriger Brauereihefe. *Hoppe Seyler's Z. physiol. chem.*, **225**, 249.

HANAHAN D. J., WAKIL S. J., 1952. The biosynthesis of ergosterol from isotopic acetate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 167-171.

HANAHAN D. J., WAKIL S. J., 1953. The origin of some of the carbon atom of the side chain of C^{14} ergosterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 273-275.

HARTMAN R. E., HOLMLUND C. E., 1962. Binding of steroids by microorganisms. *J. Bact.*, **84**, 1254-1259.

HENNING U., MÖSLEIN E. M., LYNEN F., 1959. Biosynthesis of Terpenes. V. Formation of 5-pyrophosphomevalonic acid by Phosphomevalonic Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 259-267.

HOLMES W. L., STACK E., 1962. Gas chromatography of squalene, sterols and bile acid methyl esters. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 163-165.

HONEYWELL E. M., BILLS C. E., 1932-1933. Cerevisterol, a sterol accompagnyin ergosterol in yeast. *J. Biol. Chem.*, **99**, 71-78.

HONEYWELL E. M., BILLS C. E., 1933. Cerevisterol : new notes on composition, properties and relation to other sterols. *J. Biol. Chem.*, **103**, 515-520.

HOPTON J. W., WOODBINE M., 1960. Fat synthesis by yeasts. I. A comparative assessment of *Hansenula* species. *J. Appl. Bact.*, **23**, 283-290.

HUBER W., EWING G. W., KRIGER J., 1945. The absorption spectra of the vitamins and provitamins D_1. *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 609-617.

HUTTERER F., 1953. Biokémiai palyamunka, Szeged. (Cité par KONSANSZKY et FAZEKAS, 1959).

IDLER D. R., BAUMANN C. A., 1953. Skin sterols. III. Sterol structure and the Liebermann-Burchard reaction. *J. Biol. Chem.*, **203**, 389-396.

JOHNSTON J. A., 1961. Effects of streptomycin on the biosynthesis of ergosterol in growing cultures and cell-free preparations of yeasts. *Antimicrobian Agents Chemotherapy*, **1961**, 254-259.

JOHNSTON J. D., BLOCH K., 1957. *In vitro* conversion of zymosterol and dihydrozymosterol to cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1145-1149.

KIEBER R. J., PAYNE W. J., APPLETON G. S., 1955. The sterol content of fungi. I. Methods for disrupting cells, extracting and determining sterols. *Appl. Microb.*, **3**, 247-248.

KINSKY S. C., 1961. Alterations in the permeability of *Neurospora crassa* due to polyene antibiotics. *J. Bact.*, **82**, 889-897.

KLEIN H. P., 1955. Synthesis of lipids in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, **69**, 620-627.

KLEIN H. P., 1957. Some observations on a cell free lipid synthesizing system from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, **73**, 530-537.

KLEIN H. P., 1960. Yeast particle fraction involved in lipid synthesis. *J. Bact.*, **80**, 665-672.

KLEIN H. P., BOOHER Z. K., 1956. A particulate fraction of yeast and its relation to lipid synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 387-388.

KLEIN H. P., LIPMANN F., 1953. The relationship of coenzyme A to lipid synthesis. I. Experiments with yeast. *J. Biol. Chem.*, **203**, 95-99.

KLEMM R., 1961. Reaction of acetic acid and other aliphatic acids on the growth of *Trichosporon pullulans*. *Arch. Mikrobiol.*, **40**, 403-417.

KODICEK E., ASHBY D. R., 1957. Formation of carbon-14-labeled sterols by yeast. *Biochem. J.*, **66**, 35P-36P.

KONSANSZKY A., 1960. Untersuchungen über den Stoffwechsel der Hefe. IV. Der Zusammenhang zwischen der Veränderung der Sauerstofftension des Nährbodens und der Ergosterinsynthese. *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, **23**, 350-359.

KONSANSZKY A., FAZEKAS A., 1959. Untersuchungen über den Stoffwechsel der Hefe. II. Die Wirkung verschiedener Porphyrinverbindungen auf die Ergosterinsynthese in Hefekulturen. *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, **22**, 818-821.

KRITCHEVSKY D., KIRK M. R., 1952. Detection of steroids in paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, **35**, 346-351.

LAMPEN J. O., ARNOW P. M., BOROWSKA Z., LASKIN A. I., 1962. Location and role of sterol at Nystatin-Binding sites. *J. Bact.*, **84**, 1152-1160.

LAMPEN J. O., ARNOW P. M., SAFFERMAN R. S., 1960. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bact.*, **80**, 200-206.

LITTLE H. N., BLOCH K., 1950. Studies on the utilization of acetic acid for the biological synthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **183**, 33-46.

MAC LEOD L. D., SMEDLEY-MAC LEAN I., 1938. The carbohydrate and fat metabolism of yeast. V. The synthesis of fat from acetic acid : the influence of metallic ions on carbohydrate and fat storage. *Biochem. J.*, **32**, 1571-1582.

MAGUIGAN W. H., WALKER E., 1940. Sterol metabolism of microorganisms. I. Yeast. *Biochem. J.*, **34**, 804-813.

MARCELET H., 1936. Présence de carbures d'hydrogène dans le produit enlevé par la désodorisation dans le raffinage de l'huile d'olive. *C. R. Acad. Sci.*, **202**, 867.

MARINI F., ARNOW P., LAMPEN J. O., 1961. The effect of monovalent cations on the inhibition of yeast metabolism by nystatin. *J. Gen. Microb.*, **24**, 51-62.

MASSENGALE O. N., BILLS C. E., PRICKETT P. S., 1931. Factors determining the ergosterol content of yeast. II. Carbohydrate sources. *J. Biol. Chem.*, **94**, 213-219.

MEDVEDEVA G. A., 1962. Comparative study of the action of chloroethylamine and X rays on yeast organisms. *2 nd Intern. Congr. of radiation research*, Abstract paper, 106.

MEISSEL M. N., 1955. L'action biologique des rayonnements ionisants sur les microorganismes. *Actes Conf. Intern. de Genève, XI*, 264-282.

MOORE P. R., BAUMANN C. A., 1952. Skin sterols. I. Colorimetric determination of cholesterol and othre sterols in skin. *J. Biol. Chem.*, **195**, 615-621.

NICOLAIDES N., 1960. The use of silicone rubber gums or grease in low concentration as stationary phase for the high temperature gas chromatographic separation of lipids. *J. Chromatog.*, **4**, 496-499.

NORMAN A. W., DE LUCA H. F., 1963. Chromatographic separation of mixtures of Vitamin D_2, Ergosterol and Tachysterol 2. *Analytical Chemistry*, **35**, 1247-1250.

NOSSAL P. M., 1954. Distribution of enzymes in cell free yeast extracts. *Biochem. J.*, **57**, 62-69.

NYMAN M. A., CHARGAFF E., 1949. On the lipoprotein particles of yeasts cells. *J. Biol. Chem.*, **180**, 741-746.

OTTKE R. C. *et al.*, 1951. Isotopic acetate and isovalerate in the synthesis of ergosterol by *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **189**, 429-433.

PARKS L. W., STARR P. R., TURNER J. R., 1962. Studies on the physiological function of yeast sterols. *VIII. Congr. Intern. Microbiologie*, Résumé A 6-10.

PENAU H., HARDY Z., 1929. Étude du complexe Digitonoside-Ergostérol. *J. Pharm. Chim.*, **9**, 145-151.

PESEZ M., HERBAIN M., 1949. Dosage de l'ergostérol. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **16**, 760-761.

PICHAPPA C. V., RAMAN T. S., SHANMUGASUNDARAM E. R. B., 1962. Ergosterol synthesis in yeast under the action of nystatin. *Experientia*, **18**, 269.

POPJAK G., GOSSELIN L., GORE I. Y., GOULD R. G., 1958. Coenzyme requirement of liver enzymes for synthesis of squalene and of sterols from DL-3-hydroxy-3-methyl (2-^{14}C) pentano-5-lactone. *Biochem. J.*, **69**, 238-248.

PREUSS L. M., PETERSON W. H., SEENBOCK H., FRED E. B., 1931. Sterol content and antirachitic activability of mold mycelia. *J. Biol. Chem.*, **90**, 369-384.

PRICKETT P. S., MASSÉNGALÉ O. N., COX W. M. jr, BILLS C. E., 1930. Factors determining the ergosterol content of fungi. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **27**, 701-702.

RAJAGOPALAN K. V., SARMA P. S., 1958. Effect of sulfanilamide on formation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, **69**, 53-56.

SCHOENHEIMER R., DAM H., GOTTENBERG K., 1935. The absence of allocholesterol in the organism. *J. Biol. Chem.*, **110**, 659-665.

SCHOENHEIMER R., SPERRY W. M., 1934. A micro-method for the determination of free and combined cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **106**, 745-760.

SCHWENK E., ALEXANDER G. J., 1958. Biogenesis of yeast sterols. II. Formation of ergosterol in yeast homogenates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 65-74.

SHAW W. H., JEFFERIES J. P., 1953. The determination of ergosterol in yeast. Part I — II — III — IV. *The Analyst*, **78**, 509-528.

SKEGGS H. R., *et al.*, 1956. Discovery of a new acetate replacing factor. *J. Bact.*, **72**, 519-524.

SMEDLEY-MAC LEAN I., 1928. The isolation of a second sterol from yeast fat. *Biochem. J.*, **22**, 22-26.

SOBOTKA M., HALDEN W., BILGER F., 1935. Zur Kenntnis des Fett u. Lipoidstoffwechsels der Hefen. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **234**, 1-20.

SOKUROVA E. N., 1958. X-ray induced hereditary changes in yeast organisms accumulating increased amounts of ergosterol. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, **119**, 265-266.

SONDERHOFF R., THOMAS H., 1937. Enzymic dehydrogenation of trideuteroacetic acid. *Ann. Chem.*, **530**, 195-213.

STARR P. R., PARKS L. W., 1962. Some factors affecting sterol formation in *S. cerevisiae*. *J.Bact.*, **83**, 1042-1046.

STARR P. R., PARKS L. W., 1962. Effect of temperature on sterol metabolism in yeast. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **59**, 107-110.

STOUDT T. H., FOSTER J. W., 1954. The microbiological synthesis of ergosterol. I. Assay procedure *Appl. Microb.*, **2**, 385-387.

TAMURA G., FOLKERS K., 1958. Identity of mevalonic and hiochic acids. *J. Org. Chem.*, **23**, 772.

TANRET C., 1889. Sur un nouveau principe immédiat de l'ergot de seigle, l'ergostérine. *C. R. Acad.*, **108**, 98.

TÄUFEL K., HEINISCH H., HEIMANN W., 1940. Zur Frage der Verbreitung von Squalen in pflanzlichen Fetten. *Biochem. Z.*, **303**, 324-328.

TAVORMINA P. A., GIBBS M. H., HUFF J. W., 1956. The utilization of β-hydroxy-β-methyl-δ-valerolactone in cholesterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498-4499.

TCHEN T. T., 1958. Mevalonic Kinase : purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **233**, 1100-1103.

TCHEN T. T., BLOCH K., 1957. On the conversion of squalene to lanosterol *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **226**, 921-930.

TERROINE E. F., *et al.*, 1927. La formation des stérols est-elle liée au métabolisme des matières grasses ? *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 678.

USDIN V. R., BURRELL R. C., 1952. Preliminary study of the lipids of *Rhodotorula gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 172-177.

WENCK P. R., PETERSON W. H., GRENNE H. C., 1935. Chemistry of mold tissue. VIII. Innate factors influencing growth and sterol production of *Aspergillus fisheri*. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk.*, **92**, 234-238.

WHITE A. G. C., WERKMAN C. H., 1948. Fat synthesis in yeast. *Arch. Biochem.*, **17**, 475-482.

WIELAND H., ASSANO M., 1929. Zur Kenntnis der Sterine der Hefe. *Annalen*, **473**, 300-312.

WIELAND H., BENEND W., 1943. Einige Beobachtung über die Hydrierung von Sterinen. *Annalen*, **554**, 1-9.

WIELAND H., GOUCH G. A. C., 1930. Zur Kenntnis der Sterine der Hefe. II. *Annalen*, **482**, 36-50.

WIELAND H., RATH F., HESSE H., 1941. Die Nebensterine der Hefe. VIII. Zur Konstitution von Ascosterin, Faecosterin, Episterin, Neosterin. *Ann.*, **548**, 34-50.

WOLF D. E., HOFFMAN C. H., ALDRICH P. E., SKEGGS H. R., 1956. β-hydroxy-β-methyl-δ-valerolactone (divalonic acid), a new biological factor. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4499.

WÜERSCH J., HUANG R. L., BLOCH K., 1952. The origin of the isooctyl side chain of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **195**, 439-446.

ZORKÓCZY G., 1939. Process for increasing the ergosterol content of yeast. *German Patent* 720.007, Class 6 *a*, Group 20, 25 April.

ZORKÓCZY G., 1940. Die Entstehung des Ergosterin in der Hefe. *Chem. Zentr.* II, 913.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-10-1964

Dépôt légal : 4e trimestre 1964. *N° d'impression : 696.*

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 13 1964 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (4), 359-378.

LA SÉPARATION DES ANTHOCYANNES DIGLUCOSIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET LEUR DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

L. DEIBNER, M. BOURZEIX, et Mireille CABIBEL-HUGUES

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

La séparation des anthocyannes diglucosides du raisin et du vin par chromatographie sur couche mince n'est pas encore entrée dans la pratique courante. Aussi a-t-il semblé utile de faire sur ce point des recherches systématiques.

Cette séparation étant ainsi réalisée, on s'est appliqué à la mise au point du dosage spectrophotométrique des diglucosides.

INTRODUCTION

Parmi les substances polyphénoliques naturelles étudiées par la chromatographie sur couche mince, les anthocyannes font l'objet seulement de quelques rares travaux, signalés dans les ouvrages de RANDERATH (1963) et de STAHL (1962 *a*, *b*.) La mise au point de WOLLISH (1961) n'indique aucun mémoire paru avant le mois d'août 1961. En effet, les premières publications concernant l'application de la chromatographie sur couche mince aux anthocyannes voient le jour au cours de l'année 1961. Ce sont, en particulier, celles de STAHL et SCHORN (1961), qui utilisent la silice. L'année suivante, BIRKOFER et ses collaborateurs (1962) étudient la séparation des anthocyannes et des anthocyanidols au moyen du mélange de polyacrylnitrile et de perlon (nylon). HESS et MEYER (1962) emploient pour la séparation des anthocyannes la silice et les mélanges des différents solvants comme l'acide formique, le *n*-butanol, l'acétate d'éthyle. NYBOM (1963 1964) utilise de la cellulose pour séparer les anthocyannes des jus de fruits et, en particulier, du jus de cassis.

R. PARIS et M. PARIS (1963) constatent qu'une bonne séparation des anthocyannosides sur couche de cellulose est obtenue avec, comme solvant, le mélange *n*-butanol-

acide acétique-eau (4 : 1 : 5), connu sous le nom de « butanol-acétique » de PATRIDGE (1948), ou avec le butanol chlorhydrique ou encore l'acide acétique à 15 p.100.

En ce qui concerne les anthocyanidols, le butanol chlorhydrique (*n*-butanol — 1 vol., HCl 2 N — 1 vol.), contenant 10. p 100 d'acétate d'éthyle, donne des résultats les plus favorables. Enfin TANNER et RENTSCHLER (1963) étudient la séparation et l'identification des anthocyannes sur couche de silice à l'aide du butanol acétique de PARTRIDGE et du mélange de formiate d'éthyle, de méthyléthylcétone, d'acide formique et d'eau (3 : 4 : 1 : 2).

La chromatographie sur couche mince de gel de silice, de poudre de papier, de cellulose pour l'étude des anthocyannes du raisin et du vin a été utilisée par DRAWERT (1963). Les solvants de développement sont à base d'acétate d'éthyle, de phénol, d'acide acétique ou formique.

A part ces recherches effectuées sur les substances colorées du raisin et du vin, il n'existe pas d'autres travaux relatifs aux anthocyannes et, en particulier, à la détection et au dosage spectrophotométrique des anthocyannes diglucosides dans les vins. D'ailleurs, la chromatographie sur papier et la fluoroscopie des taches obtenues ne facilitent ni la séparation convenable des diglucosides, ni leur dosage (DEIBNER, BOURZEIX, (1964). Les recherches entreprises ont eu pour but de mettre au point un mode opératoire permettant, à l'aide de la chromatographie sur couche mince, une séparation plus nette et une détection plus aisée des anthocyannes diglucosidiques du raisin et du vin ainsi que leur dosage spectrophotométrique après une élution quantitative.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — SÉPARATION DES ANTHOCYANNES DIGLUCOSIDES ET MONOGLUCOSIDES

La séparation des anthocyannes diglucosidiques et monoglucosidiques du raisin et du vin au moyen de la chromatographie sur couche mince dépend en principe de plusieurs facteurs et, en premier lieu, de la nature de l'adsorbant, du ou des solvants de développement et de la technique chromatographique unidimensionnelle qui peut être à un solvant ou à plusieurs solvants employés successivement.

a) *Appareillage et technique utilisés*

Pour effectuer la chromatographie en couche mince nous avons fait appel à l'appareillage le plus simple, à savoir « Serva TLC — System » (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, Allemagne), fourni en France par la Société Jarre-Jacquin (Paris).

Deux techniques unidimensionnelles ont été utilisées : d'abord celle à développement unique, ensuite celle à développement multiple inventée par JEANES, WISE et DIMLER (1951) et étudiée par THOMA (1963 *a*, *b*).

La variante de cette technique proposée par STAHL (1959) qui consiste à faire un développement avec un solvant sur un longueur de 5 cm, puis à l'aide d'un autre solvant, un nouveau développement qui dépasse le précédent de 5 cm, n'a pas été étudiée.

b) *Produits étudiés*

Nous avons étudié les colorants des pellicules de raisins de *Carignan*, cueillis au Domaine de Pech-Rouge, appartenant à la Station, de *Seyve-Villard* 18315, cueillis à Fleury-d'Aude, sur le Domaine de M. GIBERT, ainsi que les anthocyannes des vins obtenus à partir des raisins de ces mêmes cépages. Des solutions de malvoside et de paeonoside ont également été expérimentées.

Voici les modes de préparation de ces produits :

1° *Anthocyannes des pellicules de raisin et des vins.*

On prélève un échantillon de 100 grains, les plus colorés, parmi 300 cueillis au hasard ; on partage chaque grain en deux moitiés à l'aide d'un canif et on sépare à la main, sous un robinet d'eau courante, la pulpe de la pellicule. On lave les pellicules à l'eau distillée, on les presse légèrement à la main et on les étale sur un tamis en nylon. Le séchage à l'air libre dure 36 heures. Ensuite, l'ensemble des pellicules séchées est mis dans un erlenmeyer de 50 ml ; on y ajoute 20 ml de mélange de méthanol (370 v.) et d'acide chlorhydrique concentré, densité 1, 19 (10 v.), on agite mécaniquement pendant 15 minutes et on laisse macérer 24 heures. Ce délai passé, on agite à nouveau énergiquement, on laisse décanter. La solution limpide est prête pour la chromatographie.

Les vins expérimentés ont été obtenus à la suite d'une fermentation et d'une macération des baies, sans rafles, qui ont duré 28 jours. Après décuvage, les vins de goutte ont été mis en bouteilles de 375 ml sans addition d'anhydride sulfureux.

2° *Anthocyannes de référence.*

Le diglucoside du malvidol ou malvoside (Société Fluka, Suisse) a été utilisé en solution aqueuse décinormale d'acide chlorhydrique.

La solution de paeonoside ou de diglucoside du paeonidol a été obtenue à partir de pétales des fleurs de Pivoine rouge (*Paeonia*) par macération pendant 44 heures dans une solution méthanolique d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 (BATE-SMITH, 1951), (HÄNSEL, 1959), à raison de 2,6 ml de solution pour 1 g. de pétales.

c) *Étude des différents facteurs*

La nature de l'adsorbant, son épaisseur, le volume des liquides à chromatographier et le ou les solvants de développement jouent un rôle important.

1° *Choix de l'adsorbant et épaisseur optimale de la couche.*

Plusieurs adsorbants ont été essayés. La silice n'a pas donné de résultats intéressants en raison de la formation de traînées jaunâtres et de la mauvaise fluorescence des taches en lumière de Wood. La célite (terre d'infusoires) ne s'est pas prêtée à la fabrication facile des chromatoplaques. L'alumine a donné de très mauvaises séparations avec, en outre, une montée des solvants très longue. En ce qui concerne la poudre de polyamide (nylon), elle est difficile à étaler, la granulation du produit en notre possession étant trop grossière. Par contre, la cellulose (Serva-Cellulose TLC) a permis d'obtenir une séparation très nette et des fluorescences bien visibles. même sans révélation par les vapeurs chlorhydriques.

L'épaisseur optimale de la couche de cellulose sur les plaques est de 1 mm. Une couche de 0,300 mm est très difficile à étaler et pour une couche de 0,500 mm les volumes chromatographiques ne peuvent pas dépasser 20 microlitres, ce qui est trop peu pour l'analyse qualitative et surtout quantitative. Notons que STAHL et ses collaborateurs (1956) ont montré qu'à partir de 0,150 mm les Rf ne sont pas affectés par l'épaisseur.

Dans ces essais, la quantité optimale de solution à chromatographier est de 50 microlitres. On peut utiliser un volume de 100 µl, mais dans ce cas la séparation n'est pas aussi nette.

2° *Choix des solvants de développement.*

α) *Chromatographie à un seul solvant.*

Nous avons essayé un certain nombre de solvants en chromatographie à un seul solvant et à un seul développement, en utilisant les colorants extraits de pellicules de *Carignan* et de *Seyve-Villard 18315.*

On a obtenu avec une solution d'acide citrique à 6 g. par litre, contenant 5 p. 100 de *n*-butanol, une séparation entre diglucosides et monoglucosides acceptable au point de vue qualitatif, mais celle-ci n'était pas suffisante pour un éventuel dosage. Finalement il est apparu nécessaire de s'adresser à la chromatographie undimensionnelle à double développement.

β) *Chromatographie unidimensionnelle à deux solvants.*

Pour réussir la chromatographie unidimensionnelle multiple des anthocyannes du raisin et du vin, nous avons fait appel aux solvants utilisés pour l'étude chromatographique sur papier des substances polyphénoliques du thé, à savoir la variante du butanol acétique de PARTRIDGE (1948), proposée par ROBERTS et WOOD (1951) et l'acide acétique à 2 p. 100 (CARTWRIGHT et ROBERTS, 1954),

(ROBERTS, 1956). Nous avons employé, comme premier solvant, le mélange indiqué par ZAPROMETOV et SOBOLEVA (1954), en le rendant plus acide, à savoir le butanol normal (40) — acide acétique (12) — eau (18), l'acide acétique à 2 p. 100 (v) étant utilisé comme deuxième solvant.

Devant l'insuccès de ces essais nous avons fait appel à un solvant bien moins acide, utilisé par WHITE (1956) pour l'étude d'extrait de myrobolan obtenu à partir de *Terminalia chebula*. Ce solvant est le mélange suivant : alcool amylique tertiaire (6) — acide acétique (0,1) — eau (94). Il a été préconisé en 1952 par WHITE, KIRBY, KNOWLES pour l'étude des tanins hydrolysables (WHITE, 1958). Utilisé seul, il ne nous a pas donné un très bon résultat, mais en combinaison avec l'acide acétique à 2 p. 100 en volume utilisé pour le deuxième développement il fournit une des meilleures séparations. En inversant l'ordre de passage, c'est-à-dire, en faisant passer d'abord l'acide acétique à 2 p. 100 et ensuite le mélange ternaire, on obtient un résultat sensiblement meilleur avec les extraits de pellicules et avec les vins.

Dans ces conditions, nous avons poursuivi l'étude de la chromatographie unidimensionnelle multiple en utilisant uniquement les deux solvants mentionnés.

d) *Etude de la chromatographie multiple*

1° *Développements.*

Le développement avec chaque solvant s'effectue dans les cuves en verre en atmosphère saturée.

Le temps de parcours est en moyenne d'une heure trente minutes pour chaque solvant. Les plaques doivent être séchées à température ambiante entre les deux passages et préservées de l'action de la lumière.

2° *Aspect des chromatoplaques.*

Tout d'abord la chromatographie sur couche mince de cellulose avec les deux solvants choisis a été expérimentée avec une solution concentrée de malvoside commercial (Sté Fluka, Suisse), à 2,28 g. par litre d'une solution aqueuse décinormale d'acide chlorhydrique. Les volumes chromatographiques de deux microlitres ont été déposés sous forme de taches circulaires. Après le premier développement avec la solution d'acide acétique à 2 p. 100, les Rf du malvoside et du monoglucoside du malvidol, se trouvant toujours dans les solutions du malvoside en raison de son hydrolyse partielle, sont respectivement 0,43 et 0,09. Le front de la tache du malvoside se trouve à 9 cm de la ligne de départ, le front du solvant étant à 15 cm, c'est-à-dire que la tache du malvoside atteint les 6/10 de la longueur de développement. Le deuxième développement avec le mélange-alcool amylique tertiaire-acide acétique-eau détermine une nouvelle migration. Le front de la tache de malvoside atteint 13,5 cm, c'est-à-dire parcourt les 9/10 de la longueur de développement.

Les Rf du malvoside et du monoglucoside deviennent 0,75 et 0,17 contre 0,43 et 0,09 après le premier développement. La distance entre les taches du malvoside et des monoglucoside du malvidol devient 3,5 cm au lieu de 1.2 après le premier développement.

D'autres essais ont été effectués sur la solution de malvoside (Sté Fluka) à 1 g. par litre de solution aqueuse décinormale d'acide chlorhydrique et sur l'extrait de colorant de pétales des fleurs de Pivoine rouge (*Paeonia*). Les vins de *Carignan* (récolte 1963) et de *Seyve-Villard 18 315* (récolte 1963) ont été expérimentés ensuite.

Les volumes chromatographiques de 50 microlitres ont été appliqués sous formes de bandes de 2 cm de longueur et de 6-7 mm de largeur.

La figure 1 représente les chromatogrammes obtenus.

On remarque que les Rf du malvoside et du monoglucoside du malvidol sont élevés par rapport aux Rf indiqués plus haut : 0,83 et 0,13 ce qui s'explique par l'effet de surcharge, la solution du malvoside étant cette fois moins concentrée et de plus répartie suivant une bande de départ de 2 cm au lieu d'une tache circulaire.

Le Rf du paeonoside est 0,65, mais sa concentration dans l'extrait est de 4 fois plus forte que celle des extraits habituels.

Une fois mélangés, ces deux diglucosides ont les mêmes Rf; d'ailleurs leur séparation reste toujours un problème analytique non résolu. Une faible tache rose orange, de Rf 0,11, pourrait correspondre au monoglucoside du paeonidol.

Le vin de *Carignan* étudié est caractérisé par les taches de Rf 0,11 (monoglucosides) et Rf 0,03. Une très légère tache rose diffuse apparaît également au niveau de la première tache diglucosidique. Son étude est l'objet d'un travail spécial.

En ce qui concerne le vin de *Seyve-Villard 18315*, ses diglucosides ont les Rf 0,67 et 0,85 qui les placent très haut. On peut souvent observer assez nettement trois diglucosides différents. D'ailleurs nous avons identifié ces trois diglucosides élués suivant le procédé exposé plus loin. Leur identification a été faite au moyen de la chromatographie de partage sur papier selon BATE-SMITH

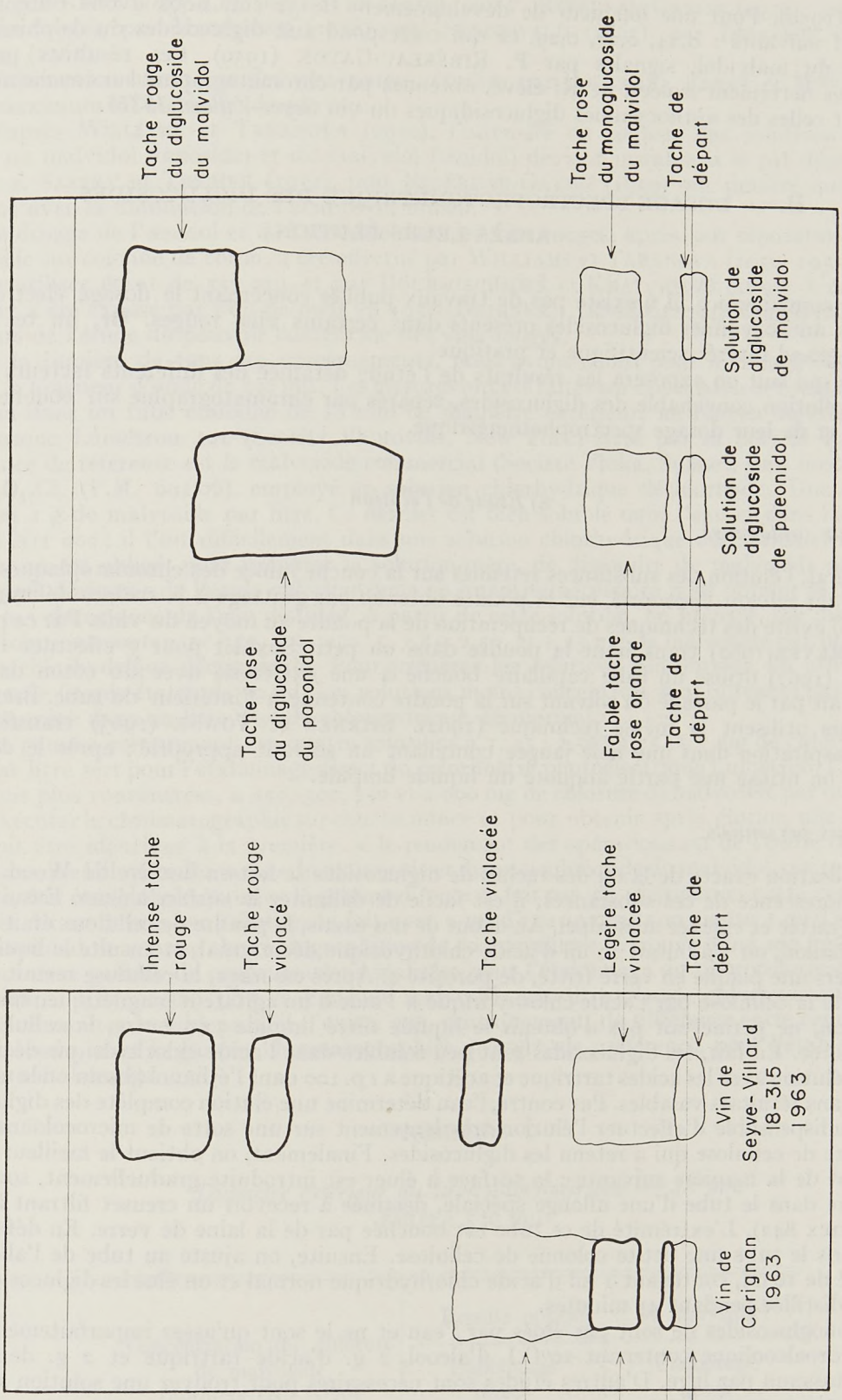


FIG. 1. — *Chromatogrammes des anthocyannes sur couche mince de cellulose*

et WESTAL (1950). Pour une longueur de développement de 31 cm, nous avons obtenu trois taches de Rf suivants : 0,14, 0,21, 0,29, ce qui correspond aux diglucosides du delphinidol, du petunidol et du malvidol, signalés par P. RIBÉREAU-GAYON (1959). Ces résultats prouvent que les taches nettement isolées, de Rf élevé, obtenues par chromatographie sur couche mince de cellulose sont celles des anthocyannes diglucosidiques du vin *Seyve-Villard 18315*.

B. — DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DES DIGLUCOSIDES APRÈS LEURS ÉLUTION

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux publiés concernant le dosage électrophotométrique des anthocyannes diglucosides présents dans certains vins rouges. Or, un tel dosage présente un grand intérêt scientifique et pratique.

Dans ce qui suit on exposera les résultats de l'étude détaillée des différents facteurs responsables d'une élution convenable des diglucosides, séparés par chromatographie sur couche mince de cellulose, et de leur dosage spectrophotométrique.

a) *Étude de l'élution*

1° *Travaux antérieurs.*

En général, l'élution des substances retenues sur la couche mince des chromatoplaques s'effectue, à l'aide du solvant approprié, sur la poudre obtenue par grattage à la surface délimitée. Actuellement, il existe des techniques de récupération de la poudre au moyen du vide. Par ce procédé, RITTER et MEYER(1962) transférent la poudre dans un petit Soxhlet pour y effectuer l'extraction. JANAK (1962) utilise un tube capillaire bouché à une extrémité avec du coton de verre; l'élution se fait par le passage du solvant sur la poudre contenue à l'intérieur du tube. BIRD et ses collaborateurs utilisent la même technique (1962). SPIKNER et TOWNE (1963) transfèrent la poudre par aspiration dans une fiole jaugée contenant un solvant approprié ; après le dépôt de l'adsorbant, on utilise une partie aliquote du liquide limpide.

2° *Essais personnels.*

La localisation exacte de la ou des taches de diglucosides se fait en lumière de Wood. En raison de la fluorescence de ces substances, il est facile de délimiter la surface à éluer. Ensuite, cette surface est grattée et enlevée au scalpel. Au début de nos essais, la poudre de cellulose était recueillie dans un ballon, on y ajoutait 10 ml d'acide chlorhydrique décinormal, et ensuite le liquide était filtré à travers une plaque en verre fritté, de porosité 4. Après essorage, la cellulose restait rose. Le traitement de la cellulose par l'acide chlorhydrique à l'aide d'un agitateur magnétique, suivi d'une centrifugation, ne permettait pas d'obtenir le liquide filtré limpide ; en outre, la cellulose était toujours colorée. En fait, les diglucosides sont peu solubles dans l'acide chlorhydrique décinormal. Les essais d'élution avec les acides tartrique et acétique à 1 p. 100 dans l'éthanol absolu ou le méthanol sont restés sans résultats valables. Par contre, l'eau détermine une élution complète des diglucosides. Mais il est indispensable d'effectuer l'élution très lentement sur une sorte de microcolonne formée par la poudre de cellulose qui a retenu les diglucosides. Finalement, on obtient le meilleur résultat en procédant de la manière suivante : la surface à éluer est introduite graduellement, sous forme d'une poudre dans le tube d'une allonge spéciale, destinée à recevoir un creuset filtrant à plaque poreuse (Pyrex 842). L'extrémité de ce tube est bouchée par de la laine de verre. En définitive, il se forme dans le tube une petite colonne de cellulose. Ensuite, on ajuste au tube de l'allonge un ballon jaugé de 10 ml, contenant 1 ml d'acide chlorhydrique normal et on élue les diglucosides avec 9 ml d'eau distillée pendant 45 minutes.

Les monoglucosides ne sont pas élués par l'eau et ne le sont qu'assez imparfaitement par le mélange hydroalcoolique contenant 10°G.L d'alcool, 2 g. d'acide tartrique et 2 g. de tartrate acide de potassium par litre. D'autres études sont nécessaires pour trouver une solution à ce problème analytique particulier.

b) *Dosage spectrophotométrique des diglucosides*

Les premiers spectres des anthocyannes ont été obtenus par SCHOU (1927) qui a montré l'existence d'un maximum d'absorption aux environs de 520 mμ dans le visible et de 270 mμ dans le l'ultra violet. D'autres études spectrophotométriques ont été effectuées par HAYASHI (1936-1937), par SPAETH et ROSENBLATT (1950), par BATE-SMITH (1954), par ROBINSON (1954), par NORDSTRÖM

(1956), par ROUX (1957 *a,b*), par BAYER (1959), par P. RIBÉREAU-GAYON (1959), par SASTRY et TISCHER (1952), par HARBORNE (1958), par SENGEWALD (1961), par INGALSBE, NEUBERT et CARTER (1963).

L'absorption lumineuse des vins rouges, étudiée par BOUTARIC, FERRÉ et Mme ROY (1937), a son maximum au voisinage de 520 mμ.

D'après WILLIAMS et TARANOVA (1950), l'intensité de couleur des solutions du monoglucoside du malvidol (œnoside) et du malvidol (œnidol) devient instable si le pH dépasse la valeur de 1 - 2. SASTRY et TISCHER (1952), puis RIBÉREAU-GAYON (1959) ont montré que l'absorption diminue avec la diminution de l'acidité du milieu.

Le dosage de l'œnidol et de l'œnoside dans les vins rouges, après leur séparation par chromatographie sur colonne de coton, a été effectué par WILLIAMS et TARANOVA (1950, 1951), la longueur d'onde utilisée étant de 535 mμ, et par DOURMISCHIDZÉ et KHATCHIDZÉ (1952). L'essentiel de ces travaux a été exposé par l'un de nous en 1952 (DEIBNER). JENSEN (1954) a appliqué ces procédés au cours de l'étude du pouvoir bactéricide des vins rouges.

A la lumière de tous ces enseignements, nous avons choisi pour le dosage électrophotométrique la longueur d'onde de 530 mμ. Les mesures ont été faites sur une épaisseur constante de liquide contenu dans un tube étalonné de 18 mm de diamètre extérieur, au moyen du colorimètre photoélectrique Lumétron 401 (Société Photovolt, New York) livré par la Société Paris-Labo. La substance de référence est le malvoside commercial (Société Fluka, Suisse), sous forme de chlorure $C_{29}H_{35}O_{17}Cl$, (P.M. 691,06), employé en solution chlorhydrique décinormale. Une solution-mère contient 1 g de malvoside par litre. Ce dernier est bien soluble dans l'eau et dans l'acide chlorhydrique N/1 000 ; il l'est difficilement dans une solution chlorhydrique décinormale. Dans ces conditions, on est obligé, pour préparer la solution-mère, de dissoudre du malvoside dans l'eau distillée, puis d'ajouter de l'acide chlorhydrique en quantité nécessaire pour obtenir le pH 1 et compléter le volume avec de l'eau distilléé. A partir de cette solution, on prépare, par dilution, une série de solutions contenant 750, 500, 250, 5, 3,75, 2,50, et 1,25 mg de malvoside par litre de solution d'acide chlorhydrique décinormale. Pour préparer les solutions concentrées, on utilise toujours la même fiole jaugée étalon de 10 ml. Les solutions moins concentrées sont obtenues par dilution de la solution-mère dans un litre d'acide chlorhydrique décinormal.

La gamme comprenant ces quatre solutions à 1, 25 ; 2,50 ; 3,75 et 5 mg de chlorure de malvoside par litre sert pour l'étalonnage direct du colorimètre photoélectrique Lumétron. L'autre série de solutions plus concentrées, à 250, 500, 750 et 1 000 mg de chlorure de malvoside par litre, est utilisée pour exécuter la chromatographie sur couche mince et pour obtenir après élution une autre gamme qui doit être identique à la première, si le rendement des opérations est de l'ordre de 100 p. 100. Signalons que l'élution des taches du malvoside et du monoglucoside du malvidol, qui se forme par hydrolyse, doit être globale, puisque la gamme directe ne fait pas de distinction entre ces deux anthocyannes. Étant donné que l'élution se fait avec 9 ml d'eau auxquels on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique normal, le volume chromatographique de 50 microlitres se trouve dilué 200 fois et finalement on a la même gamme de concentrations réalisées pour l'étalonnage du photocolorimètre électrique c'est-à-dire, 1,25 ; 2,50 ; 3,75 et 5 mg de malvoside par litre d'acide chlorhydrique décinormal. Comme le montre le tableau 1, il n'existe pas, pratiquement, de différence entre ces deux gammes. Bien entendu, c'est la gamme chromatographiée qui sert, de préférence, pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.

TABLEAU I

Diamètre extérieur du tube colorimétrique — 18 mm
Filtre : 530 mμ

Concentration du chlorure de malvoside (mg/litre HCl N/10)	Densité optique × 10 (moyenne)	
	Étalonnage direct	Étalonnage après chromatographie
1,25	0,40	0,45
2,50	0,85	0,80
3,75	1,25	1,30
5,00	1,60	1,60

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont satisfaisants, En effet, l'échelle du photocolorimètre Lumétron permet de lire ± 0,05 (D. O. × 10) ou 0,005 en valeur vraie. Les variations constatées sont de cet ordre de grandeur.

On ne peut pas dépasser la concentration de 10 mg de chlorure de malvoside par litre. En effet la densité optique dépasse alors 0,3 ce qui correspond à la division 3 (0,3 × 10) du photocolorimètre Lumétron. Au-delà, la courbe étalon n'est plus une droite. Le photocolorimètre Lumétron présente donc l'inconvénient d'exiger des solutions à faible densité optique.

Le seuil de sensibilité du photocolorimètre Lumétron se situe aux environs de 0,3 mg (0,312 mg) de malvoside par litre. Cela correspond à une densité optique de 0,01, laquelle provoque une déviation de l'aiguille de 0,1, division de l'échelle de l'appareil qui est graduée en densités optiques décuplées.

Après chromatographie sur couche mince de 50 microlitres de solution de chlorure de malvoside et élution de la tache correspondante, laquelle s'accompagne d'une dilution de 200 fois, la quantité minimale de ce diglucoside, dosable dans une solution de départ, est de 62,4 mg par litre. En doublant le volume chromatographique, il est possible de doser 31,2 mg de chlorure de malvoside par litre.

Le dosage de quantités plus faibles de malvoside ou de diglucosides, en général, nécessite leur séparation et la concentration à l'aide d'acétate basique de plomb, comme nous l'avons montré dans une publication parue en 1963 (DEIBNER, BOURZEIX).

III. — MÉTHODE PROPOSÉE

A. — SÉPARATION DES ANTHOCYANNES DIGLUCOSIDES

Comme nous l'avons précisé dans ce qui précéde, l'appareillage de Serva TLC system est employé.

a) *Préparation des couches de cellulose sur les plaques de verre*

Les plaques de verre (longueur 20 cm, largeur 10 cm, épaisseur 6 mm) doivent être complètement dégraissées, car la moindre trace de substances grasses empêche l'étalement de la cellulose. A cet effet, il est indispensable de les laver au mélange sulfochromique par immersion dans une cuvette, ensuite de les rincer à l'eau courante, les frotter avec une poudre à récurer, les rincer à nouveau à l'eau courante et à l'eau distillée et enfin de les sécher avec du papier-filtre.

Pour étaler une couche de cellulose de 1 mm d'épaisseur, il est nécessaire de préparer une suspension d'un gramme de Serva-Cellulose TLC (sans gypse) dans 7 ml d'eau distillée ; à cet effet on agite le mélange dans un erlenmeyer de 50 ml bouché à l'émeri à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 5 minutes. (Il est plus commode encore de disposer d'un broyeur électrique permettant de préparer la suspension cellulosique en plus grande quantité). On verse la totalité de cette suspension sur la plaque, on l'étale à l'aide de l'étaleur de couche. Une fois le revêtement de la plaque terminé, on laisse sécher pendant 12 heures à la température du laboratoire.

b) *Élaboration des chromatoplaques*

On trace sur la couche cellulosique à l'aide d'un crayon une ligne de départ située à 3 cm du bord inférieur de la plaque, également une autre ligne à 2 cm du bord supérieur pour marquer le front d'arrêt du solvant. Finalement on dispose d'une longueur de développement de 15 cm. Pour faciliter la pose des taches de départ sur la couche cellulosique et leur séchage on utilise l'appareil dérivant des « orgues chromatographiques » (DEIBNER, BOURZEIX, 1960, 1963 *a*), représenté sur la figure 2.

Le rebord 4, sur lequel repose l'extrémité inférieure de la plaque, a une largeur de 2 cm. La plaque en matière plastique 6, de 7,5 cm de largeur, s'avance de 2,9 cm sur la chromatoplaque. La distance entre cette plaque et le tube en matière plastique 11 est de 1,5 cm. Ce tube est percé dans sa partie inférieure de trous (2 trous par cm) de 3 mm de diamètre, distribuant les jets d'air fourni par une soufflerie.

Le liquide à chromatographier est disposé à l'aide d'une pipette de 10 microlitres (Serva TLC) sous forme de traits de 2 cm séparés les uns des autres par un intervalle d'au moins 1,5 cm. En employant un volume de 50 microlitres, on obtient des bandes de départ larges de 6-7 mm. Après chaque dépôt de 10 microlitres il faut surveiller le séchage parfait des bandes.

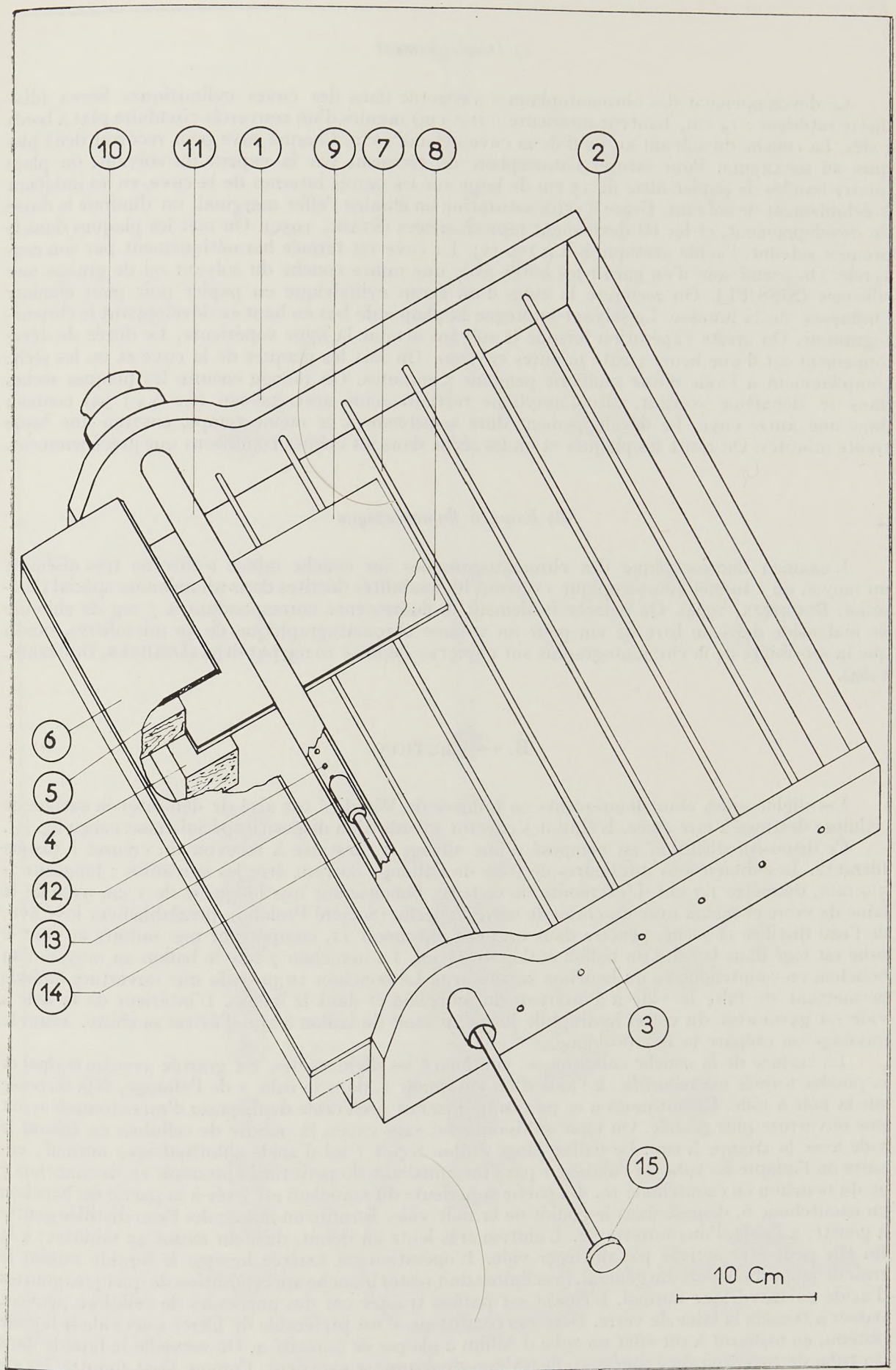


FIG. 2. — *Dispositif facilitant l'élaboration des chromatogrammes sur couche mince*

c) *Développement*

Le développement des chromatoplaques s'effectue dans des cuves cylindriques Serva (diamètre intérieur : 14 cm, hauteur intérieure : 21,5 cm) munies d'un couvercle circulaire plat à bords rodés. La couche du solvant au fond de la cuve atteint 1 cm. Chaque cuve peut recevoir deux plaques au maximum. Pour saturer l'atmosphère du récipient par la vapeur du solvant, on place quatre bandes de papier-filtre de 15 cm de large sur les parois internes de la cuve, en les imbibant préalablement de solvant. Grâce à cette saturation on élimine l'effet marginal, on diminue la durée du développement, et les Rf deviennent reproductibles (STAHL, 1959). On met les plaques dans le premier solvant, l'acide acétique à 2 p.100 (v). La cuve est fermée hermétiquement par son couvercle. On prend soin d'en garnir les bords avec une mince couche du solvant ou de graisse aux silicones (SISS/PL). On recouvre la cuve d'un écran cylindrique en papier noir pour éliminer l'influence de la lumière. Le solvant imprègne la plaque de bas en haut en développant le chromatogramme. On arrête l'opération lorsque le solvant atteint la ligne supérieure. Le durée du développement est d'une heure trente minutes environ. On sort les plaques de la cuve et on les sèche complètement à l'aide d'une soufflerie pendant 5 minutes. On plonge ensuite les plaques sèches dans le deuxième solvant, alcool amylique tertiaire-acide acétique-eau (6 : 0,1 : 94) contenu dans une autre cuve. Le développement dure sensiblement le même temps, environ une heure trente minutes. On retire les plaques et on les sèche dans les mêmes conditions que précédemment.

d) *Examen fluoroscopique*

L'examen fluoroscopique des chromatogrammes sur couche mince s'effectue très aisément au moyen du « tunnel fluoroscopique » suivant les modalités décrites dans un mémoire spécial (DEIBNER, BOURZEIX, 1964). On détecte facilement la fluorescence correspondant à 5 mg de chlorure de malvoside dans un litre de vin pour un volume chromatographique de 50 microlitres, tandis que la sensibilité de la chromatographie sur papier ne dépasse 10 mg par litre. (DEIBNER, BOURZEIX, 1964).

B. — ÉLUTION

Les diglucosides étant fluorescents en lumière de Wood, il est aisé de délimiter la surface de cellulose destinée à être éluée. L'élution s'effectue à l'aide d'un dispositif spécialement conçu fig. (3).

Ce dispositif d'élution est composé d'une allonge 1, destinée à recevoir un creuset à plaque filtrante. Les dimensions intérieures de tube de l'allonge doivent être les suivantes : longueur 7-5-9 mm, diamètre 1,7 cm. L'extrémité de ce tube, bouchée sur une longueur de 1 cm avec de la laine de verre et mieux avec du coton de verre hyperfin (Société Prolabo), préalablement lavé avec de l'eau distillée et séché, pénètre dans un petit entonnoir 11, comportant une rainure et dont le tube est logé dans le col d'un ballon étalon de 10 ml. Le manchon 7 fixe le ballon au moyen d'un bouchon en caoutchouc 10 au bouchon supérieur 6. Le bouchon 10 possède une ouverture latérale permettant de faire le vide à l'intérieur du manchon et dans le ballon. L'intérieur de la fiole à vide est garni avec du coton hydrophile jusqu'au fond du ballon 8 afin d'éviter sa chute. Avant le montage on prépare la microcolonne.

La surface de la couche cellulosique, contenant les diglucosides, est grattée avec un scalpel et la poudre formée est recueillie, à l'aide d'un entonnoir 1, dans le tube 2 de l'allonge, déjà disposée sur la fiole à vide. Remarquons à ce propos qu'il serait préférable de disposer d'un entonnoir ayant une ouverture plus grande. On tasse suffisamment, sans excès, la poudre de cellulose en faisant le vide avec la trompe à eau. Le ballon jaugé étalon reçoit 1 ml d'acide chlorhydrique normal ; ensuite on l'adapte au tube de l'allonge 1 par l'intermédiaire du petit tube entonnoir 11, du manchon 7 et du bouchon en caoutchouc 10. La partie supérieure du manchon est fixée à la partie du bouchon en caoutchouc 6, disposé dans le goulot de la fiole vide. Ensuite on fait couler l'eau distillée goutte à goutte, à l'aide d'une burette 12. L'élution très lente au début, dure au moins 45 minutes ; à la fin elle peut être activée par un léger vide. L'opération est arrêtée lorsque le liquide atteint le trait de jauge du ballon. En général, la cellulose doit rester blanche après addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique normal. L'éluant est parfois trouble car des particules de cellulose peuvent passer à travers la laine de verre. Dans ces conditions, il est préférable de filtrer sous vide le liquide obtenu, en utilisant à cet effet un tube d'Allihn à plaque de porosité 4. On recueille le liquide dans un tube de précision du Lumétron, de 18 mm de diamètre extérieur. Comme l'ont montré les essais effectués, le rendement de l'opération est de l'ordre de 95-100 p. 100.

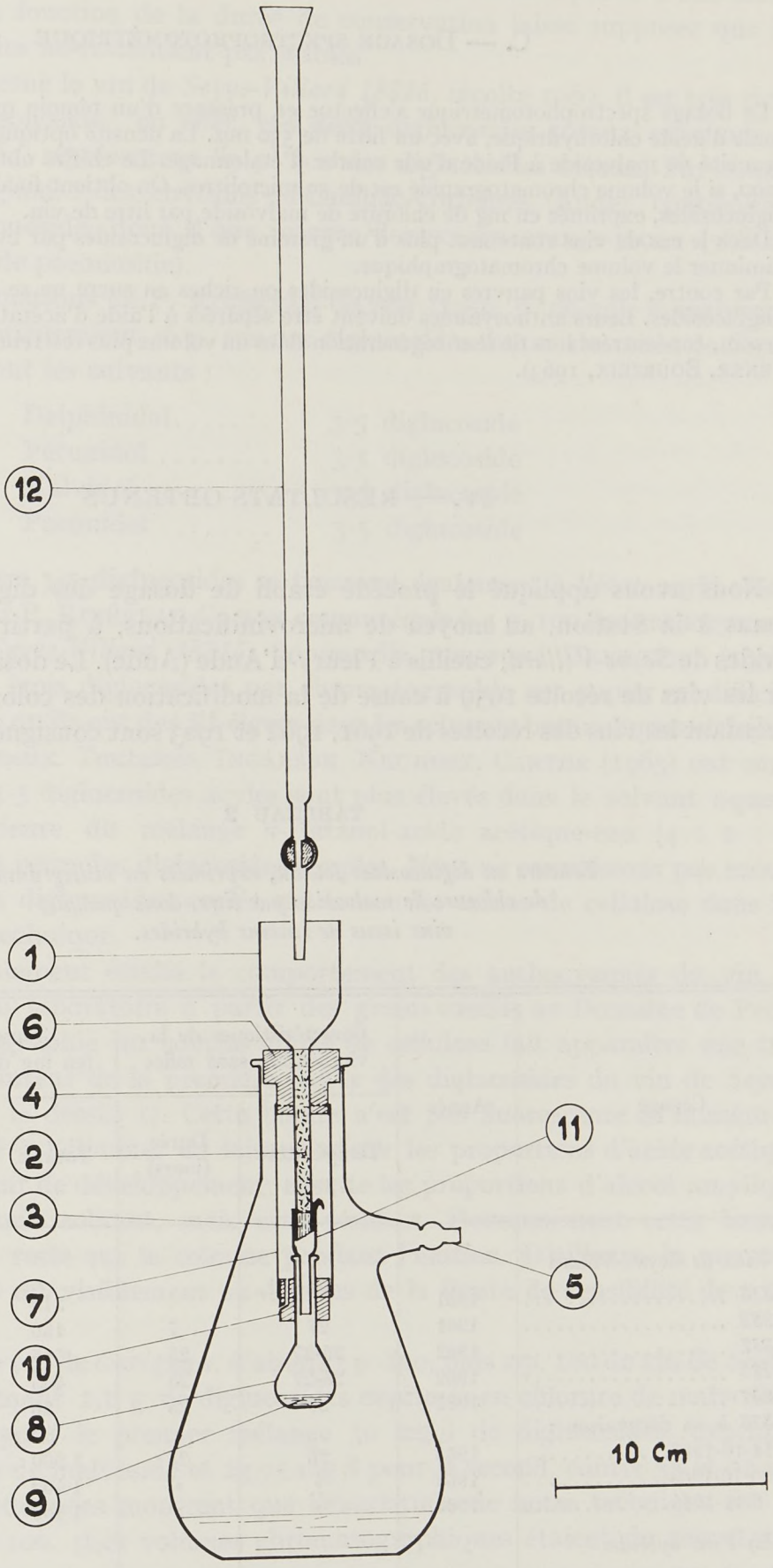


FIG. 3. — *Dispositif d'élution*

C. — Dosage spectrophotométrique

Le dosage spectrophotométrique s'effectue en présence d'un témoin qui est la solution décinormale d'acide chlorhydrique, avec un filtre de 530 mμ. La densité optique lue permet de calculer la quantité de malvoside à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Le chiffre obtenu doit être multiplié par 200, si le volume chromatographié est de 50 microlitres. On obtient finalement la teneur totale en diglucosides, exprimée en mg de chlorure de malvoside par litre de vin.

Dans le cas de vins contenant plus d'un gramme de diglucosides par litre, il faut diluer le vin ou diminuer le volume chromatographique.

Par contre, les vins pauvres en diglucosides ou riches en sucre ne se prêtent pas au dosage des diglucosides. Leurs anthocyannes doivent être séparées à l'aide d'acétate basique de plomb et, au besoin, concentrées lors de leur régénération dans un volume plus restreint d'acide chlorhydrique (Deibner, Bourzeix, 1963).

IV. — RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons appliqué le procédé établi de dosage des diglucosides aux vins obtenus à la Station, au moyen de microvinifications, à partir des raisins rouges hybrides de *Seyve-Villard,* cueillis à Fleury-d'Aude (Aude). Le dosage a été impossible pour les vins de récolte 1959 à cause de la modification des colorants. Les résultats concernant les vins des récoltes de 1961, 1962 et 1963 sont consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Teneurs en diglucosides totaux, exprimées en milligrammes de chlorure de malvoside par litre, dans quelques vins issus de raisins hybrides.

Cépage	Année	Caractéristiques de la vinification sans rafles		Teneur en diglucosides (en mg de malvoside par litre)		
		Température	Durée (jours)	Totaux	Malvoside + Paenoside	Paenoside
A) *Vins de* Seyve-Villard						
1) *18315*	1961			310	—	—
2) *18283*	1961	27	7	150	—	—
3) *8357*	1962	26-27	25	595	—	—
4) *18283*	1962	26-27	25	435	—	—
5) *23657*	1962	26	25	96	—	—
6) *18315* à sa décuvaison :						
a) 18-10-1963.....	1963	26	28	1 900	—	—
b) 20-10-1963.....	1963	»	»	1 400	1 250	—
c) 6-11-1964.....	1963	»	»	1 100	—	—
B) *Vins hybrides*						
Conilhac-Corbières (Aude)	1963	—	—	—	—	375

La comparaison des chiffres obtenus pour les vins élaborés à partir d'une même variété de raisins en fonction de la durée de conservation laisse supposer que les teneurs en diglucosides ne resteraient pas stables.

En ce qui concerne le vin de *Seyve-Villard 18315*, récolte 1963, il est très riche en malvoside et paeonoside ; en effet, ces deux diglucosides totaux exprimés en chlorure de malvoside, représentent 89 p. 100 des diglucosides totaux. Par contre, le vin hybride, originaire des environs de Conihac-Corbières (Aude), contiendrait uniquement du paeonoside, doué d'une intense florescence orange-jaune (368 mg par litre de chlorure de paeonoside).

D'après les estimations de P. Ribéreau-Gayon (1959, p. 69-70), le malvoside et le paeonoside constitueraient 46 p. 100 des diglucosides totaux du raisin de *Seyve-Villard 18315*, qui sont les suivants :

Delphinidol.....	3-5 diglucoside
Pétunidol	3-5 diglucoside
Malvidol	3-5 diglucoside
Paeonidol	3-5 diglucoside

Les trois premiers 3-5 diglucosides se trouvent également à l'état acylé. Leur teneur est chiffrée par P. Ribéreau-Gayon comme égale à 4 p. 100 des anthocyannes totales du raisin *Seyve-Villard 18315*. Comme l'a remarqué Harbonne (1958), la séparation de ces trois diglucosides par chromatographie sur papier est difficile. Ce même auteur note qu'ils ont des Rf élevés dans les solvants butanoliques et faibles dans les solvants aqueux. Toutefois, Ingalsbe, Neubert, Carter (1963) ont constaté que les Rf des 3-5 diglucosides acylés sont plus élevés dans le solvant aqueux acide (couche inférieure du mélange *n*-Butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) et même supérieurs à ceux des diglucosides simples, Nous ne connaissons pas encore le comportement des diglucosides acylés sur la couche mince de cellulose dans les conditions de notre technique.

Nous avons également étudié le comportement des anthocyannes du vin de *Carignan*, élaboré au laboratoire à partir des grains cueillis au Domaine de Pech-Rouge. La chromatographie sur couche mince de cellulose fait apparaître une très légère bande à la hauteur de la première bande des diglucosides du vin de *Seyve-Villard 18315* (voir le dessin 1). Cette bande n'est pas fluorescente en lumière de Wood. On a cherché à l'éliminer en faisant varier les proportions d'acide acétique dans le premier solvant de développement, ensuite les proportions d'alcool amylique tertiare dans le second solvant, mais sans résultat. Heureusement cette bande, insoluble dans l'eau, reste sur la colonne pendant l'élution. D'ailleurs, la quantité de ces anthocyannes est visiblement au-dessous de la limite de sensibilité de notre technique.

En ajoutant à ce vin de *Carignan*, d'abord 3 p. 100, puis 2 p. 100 de vin de *Seyve-Villard 18315*, contenant 1,1 g de diglucosides exprimés en chlorure de malvoside, nous avons trouvé pour le premier mélange 30 mg/l de diglucosides, exprimés toujours en chlorure de malvoside et 23,75 mg/l pour le second, contre 33 et 22 mg respectivement. Ces données montrent que l'exactitude de notre technique est de l'ordre de ± 8-9 p. 100. (Les volumes chromatographiques étaient de 100 et 150 microlitres).

Les anthocyannes de vins issus des raisins de *Morastel-Bouschet*, cueillis

en 1962 à Arzens (Aude), donnent sur les chromatoplaques des taches rouges, non fluorescentes en lumière de Wood, disposées au niveau de la première tache de diglucosides du vin *Seyve-Villard 18315*. Une autre tache, rouge orangée fluorescente se situe juste au-dessus de la tache des monoglucosides. D'ailleurs, la nature de ces anthocyannes ainsi que celle des composés colorés de *Carignan* feront l'objet d'une étude spéciale.

Nous avons également déterminé le taux d'hydrolyse du chlorure de malvoside dissous dans l'acide chlorydrique décinormal. Le dosage, effectué aussitôt après la dissolution, a montré que ce taux est de l'ordre de 9,5 à 10 p. 100. D'ailleurs, la couleur des solutions chlorhydriques de chlorure de malvoside s'affaiblit avec le temps, même si celles-ci ont été conservées à l'abri de la lumière, à la température ambiante. C'est ainsi qu'on a constaté un affaiblissement de l'ordre de 4 à 4,5 p. 100 au bout de 18 heures.

Le dosage du paeonoside dans l'extrait de pétales de pivoine rouge, préparé au mois de mai 1963 et analysé 8 mois après, a révélé une teneur de 76 mg exprimée en chlorure de paeonoside ou 77,5 mg en chlorure de malvoside.

V. — VALEUR ANALYTIQUE DU PROCÉDÉ PROPOSÉ

Parmi les défauts principaux évidents du procédé proposé figure tout d'abord le faible volume chromatographique, 50 microlitres, ce qui, détermine l'éventualité d'une erreur bien naturelle, aggravée par l'utilisation d'un coefficient élevé, 200, nécessaire pour calculer la teneur en diglucosides totaux. Toutefois, c'est un défaut propre à toutes les techniques chromatographiques quantitatives sur papier ou sur couche mince.

Vient ensuite l'obligation d'exprimer cette teneur en mg de chlorure de malvoside or, la tache diglucosidique prise globalement comprend le plus souvent 3 ou 4 anthocyannes. Les trois ou quatre taches correspondantes ne sont pas suffisamment séparées les unes des autres, en particulier les taches de malvoside et paeonoside sont confondues. De plus, il n'est pas établi que les diglucosides aient la même densité optique pour une même concentration. En principe, il serait souhaitable de pouvoir séparer chaque diglucoside et de le doser ensuite en se rapportant à une courbe d'étalonnage qui lui soit propre. Mais il existe deux obstacles à cette solution : d'abord le fait que le commerce ne propose que deux diglucosides : le malvoside et, plus récemment, le paeonoside (Société Fluka, Suisse), ensuite le risque de se trouver souvent en dessous du seuil de sensibilité dans le cas d'une éventuelle séparation de chaque diglucoside. Ce seuil se situe aux environs de 30-35 mg. de chlorure de malvoside par litre, si la prise d'essai est portée à 100 microlitres. Ce seuil ne peut être abaissé en raison de la nécessité d'effectuer une dilution jusqu'à 10 ml (200 fois sur un volume chromatographique de 50 microlitres). Évidemment, il est possible de concentrer les anthocyannes par l'emploi d'acétate de plomb. Toutefois, ce réactif n'assure pas la précipitation complète des diglucosides et même est susceptible de les modifier.

A notre avis, une meilleure solution de ces problèmes consisterait dans l'utilisation de la chromatographie d'adsorption sur colonne.

D'ailleurs, l'expérimentation, actuellement en cours, a pour but d'améliorer l'efficacité de ce procédé et de rendre ainsi le dosage spectrophotométrique des diverses anthocyannes plus précis.

Malgré ces quelques réserves le procédé proposé rend possible, pour la première fois, la séparation et le dosage des diglucosides dans l'extrait de pellicules de raisin et dans le vin rouge. Sa mise au point constitue le premier pas original dans la réalisation d'un souhait exprimé en 1962 à la 4e réunion de la Sous-commission des Méthodes d'Analyses de l'Office international de la Vigne et du Vin qui est celui de disposer d'une méthode de référence permettant de connaître les teneurs en malvoside par un procédé uniquement photométrique. Si ce problème oenochimique analytique n'a pas encore trouvé sa solution idéale, définitive, les recherches effectuées ont le mérite d'aboutir, pour la première fois, à la mise au point d'un procédé spectrophotométrique de dosage des anthocyannes diglucosidiques totales. A notre avis, la connaissance de leur teneur globale est plus importante que celle concernant le malvoside. En effet, ce dernier est un des constituants de ce complexe, son absence ne constitue pas une preuve de l'absence des diglucosides en général.

Reçu pour publication en mai 1964.

SUMMARY

SEPARATION OF DIGLUCOSIDE ANTHOCYANINS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND THEIR SPECTROPHOTOMETRIC ESTIMATION

The research carried out has made an original contribution to the resolution of an important œnochemical problem; namely, the separation and detection of diglucoside anthocyanins in grapes and red wines, by using multiple unidimensional chromatography on a thin layer of cellulose, followed by spectrophotometric estimation of the resolved fractions.

The method, based on the successive use of two solvents (2 p. 100 acetic acid, and tertiary amyl alcohol acetic acid — water (6 : 0,1 : 94) allows the diglucosides to be clearly distinguished from the other anthocyanins, and the presence of 5 mg malvoside per litre of wine to be detected with the help of fluoroscopy using a Wood lamp. The diglucosides are eluted with water, using a specially designed apparatus.

The process has been used for the estimation of the total diglucosides in some wines from hybrid grapes, the results being conventionally expressed as malvoside chloride.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BATE-SMITH E., 1951. Partition chromatography. *Bioch. Soc. Symp.* **3**, 68, Cambridge.

BATE-SMITH E., 1954. Leuco-anthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J. G. B.* **58**, 122-125.

BATE-SMITH E., WESTALL R. 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. *Bioch. Biophys. Acta.* **4**, 427.

BAYER E., 1959. Über Anthocyankomplexe. II. Farbstoffe der roten, violetten und blauen Lupinenblütten. *Chem. Ber.* **92**, 1062-1071.

BIRD M. Jr,, BRICKLEY M., COMER J., HARTSHAW P., JOHNSON M. 1962. 142nd. *Nat. Meeting. Amer. Chem. Soc. Atlantic City, Abstracts, 4B* (d'après SPIKNER J., TOWNE J., 1963).

BIRKOFER L., KAISER C., MEYER-STOLL M., SUPPAN F., 1962. Dünschicht-chromatographie an Polyacrylnitril-Perlon. *Z. für Naturforsch.* **17** *b*, 352-355.

BOUTARIC A., FERRÉ L., ROY Mme M., 1937. Recherches spectrophotométriques sur la couleur des vins *Ann. Fals. Fraudes*, **30**, 196.

CARTWRIGHT R., ROBERTS E., 1954. Paper chromatography of phenolic substances. *Chem. and Ind.*, nº 36, 1389-1391.

DEIBNER L. 1952. État actuel du dosage direct des substances colorantes du raisin et du vin rouge d'après les récents travaux. *Ann. Techn. agric. I. N. R. A.*, **1**, 345-347.

DEINBER L., BOURZEIX M., 1960. Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes. *Ann. Techn. agric. I. N. R. A.* **9**, 409.

DEIBNER L., BOURZEIX M. 1963 *a*. Dispositifs pour la préparation rapide des chromatogrammes à développements radial et classique. *Ann. Techn. agric. I. N. R. A.*, **12**, 141-152.

DEIBNER L., BOURZEIX M. 1963 *b*. Sur l'extraction des composés polyphenoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Techn. agric. I. N. R. A.*, **12**, 287-312.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964 *a*. Recherches sur la détection des anthocyannes diglucosides dans les vins et les jus de raisin (par chromatographie sur papier et fluoriscopie des taches obtenues). *Ann. Techn. Agric. I. N. R. A.*, **13**, 263-282.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964 *b*. État actuel de la détection des anthocyannes diglucosides dans les vins et les jus de raisin. *Ann. Falsif. Expert. Chim.* (à paraître).

DOURMISCHIDZÊ S., KHATCHIDZÊ O., 1952. Méthode photométrique de dosage des substances colorées rouges dans le raisin et le vin (en russe). *Vinodelie i Vinogradarstvo, SSSR*, nº 1, 18-20.

DRAWERT F., 1963. Über Inhaltstoffe von Mosten und Weinen. III. Anwendung der Dünnschicht und Säulen Chromatographie zur Trennung der Anthocyane. *Vitis*, **4**, nº 1, 42-48.

HÄNSEL R., 1959. *Zellsaftlösiche Pigmente* (*Anthocyane und Flavonoïde*) in LISKENS M., *Papier Chromatographie in der Botanik*, 228-229. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

HARBORNE J., 1958. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatogr.* **1**, 437-488.

HAYASHI K., 1962. Spektrographische Untersuchungen über die Farbstoffe von Benzopyryliumtypus. V. Über die Beziehungen zwischen Lichtabsorption und Hydroxyl sowie Suckersubstitution bei den 2-phenylbenzopyrylium Farbstoffen. *Acta Phytochimica, Tokyo*, **9**, 1-24.

HESS D., MEYER C., 1962. Dünnschicht-Chromatographie von Anthocyanen. *Z. Naturforsch.* **17***b*, 853-854.

INGALSBE D., NEUBERT A., CARTER G., 1963. Grape pigments. Concord grape pigments. *Agric. Food Chem.*, **11**, 263-268.

JANAK Y., 1962. Chromatographic identification of complex mixture of high-boiling compounds. *Nature*, **195**, 696-697.

JEANES A., WISE C., DIMLER R., 1951. Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.* **23** 415-420.

JENSEN Hélène, 1954. *Recherches sur le pouvoir bactéricide des vins rouges*. Thèse Pharm. E. Drouillard éd. Bordeaux.

KIRBY K., KNOWLES K., WHITE T., 1952. Tannins. III. Fractionation of mimosa extract. *J. Soc. Leather Trades Chem.* **36** 45-59.

NORDSTRÖM C., 1956. The flavonoid glycosides of *Dalhia variabilis* IV. 3-glucosido-5- arabinosidocyanin from the variety *Dandy*. *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1491-1496.

NYBOM N., 1963. Dünnschicht-Chromatographische Anthocyanin Analyse von Fruchtsäfent. *Fruchtsäft-Industrie*, **8**, 205-214.

NYBOM N., 1964. Thin-layer chromatographic analysis of anthocyanidins. *Physiol Plant.* **17**, nº 1, 151-164.

PARIS R., PARIS M., 1963. Chromatographie en couche mince des alcaloïdes et de pigments anthocyanniques *Bull. Soc. Chim. Fr.* nº 8-9 1597-1599.

PARTRIDGE S., 1948. Filter paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and fœtal blood of sheep. *Biochem. J.* **42**, 238-248.

RANDERATH K., 1962. *Dünnschicht-Chromatographie*. Verlag Chemie. Weinheim/Bergstrasse.

RIBÉREAU-GAYON, .1959. Recherches sur les anthocyannes des végétaux. Application au genre *Vitis*. Thèse Sciences, Bordeaux, *Rev. Gen. Bot. Fr.* **65**, nº 782, 531.

RITTER F., MEYER G., 1962. Preparative thin-layer chromatography *Nature*, **193**, 941-942.

ROBINSON R., 1954. in GILLAM A., STERN E., *Electronic absorption spectroscopy in organic chemistry*, 155, E. Arnold, London. (D'après HARBORNE Y., 1958.)

ROUX D., 1957 *a*. Identification of anthocyanidins, leucoanthocyanins and 2,3 dihydroflavonols in plant tissus. *Nature* **179**, nº 4554, 305-306.

ROUX D., 1957. *b*. Some recent advances in the identification of leuco-anthocyanins and the chemistry of condensed tannins. *Nature*, **180**, 973-975.

ROBERTS E., 1956. *Paper chromatography as an aid to the elucidation of the structure of polyphenols occuring in tea*. Symposium The Chemistry of Vegetable Tannins, 87, Soc. Leather Trades Chem. Croydon (G. B.)

ROBERTS E., WOOD D., 1951. A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography. *Biochem. J.* **49** 414-422.

ROBERTS E., WOODS D., 1953. Separation of tea polyphenols on paper chromatograms. *Biochem. J.* **53**, 332-336.

SASTRY L., TISCHER R.,1952. Stability of the anthocyanin pigments in *Concord* grape juice. *Food Techn.* **6**, 264-268.

SCHOU S., 1927. Über die Lichtabsorption einiger Anthocyanidine. *Helv. Chim. Acta*, **10**, 907-915.

SENGEWALD D., 1961. *Untersuchungen über Anthocyane insbesondere über das Malvin. Beitrage zur Kenntnis der Papierchromatographie, Gewinnung und Eigenschaften der Anthocyane.* Inaug-Dissert. Frankfurt am Main.

SPAETH E., ROSENBLATT D., 1950. Partition chromatography of synthetic anthocyanidine mixtures. *Anal. Chem.*, **22**, 1321-1326.

SPIKNER J., TOWNE J., 1963. Technic for separation and solution of zones in thin layer chromatography. *Chemist. Analyst.* U.S.A., **52**, 50.

STAHL E., 1959. IV Mitteilung. Einsatzchema, Randeleffeckt, saure und basisch Schichten, Stugentechnik. *Arch. Pharm.* **292**, 411-416.

STAHL E., 1962 *a*. *Dünnschicht-Chromatographie.* In LISKENS, H. TRACEY M.. *Moderne 'Methoden der Pflanzenanalyse*, **5**, 214-229. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

STAHL E., 1962 *b*. *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.* Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

STAHL E., SCHORN P., 1961. Dünnschicht-Chromatographie hydrophiler Arzneipflanzenauszuge. VII, Mittelung : Cumarine, Flavonderivate, Hydroxysäuren, Gerbstoffe, Anthracenderivate und Flechteninhaltstoffe. *Hoppe Seylers Z. Phys. Chem.* **325**, 263-274.

STAHL E., SCHROTER G., KRAFT G., RENZ R., 1956. Dünnschricht-Chromatographie. *Pharmazie*, **11**, 633.

TANNER M., RENTSCHLER M., 1963. Über die Charakterisierung von Anthocyan-Farbstoffe mittels Dünschicht-Chromatographie. *Mittelung, Klosterneuburg. Serie* A, **13**, 156-161.

THOMA J., 1963 *a*. Application and theory of unidimensional multiple chromatography. *Anal. Chem.* **35**, nº 2, 214.

THOMA J., 1963 *b*. A quantitative approach to unidimensional multiple chromatography. *J. Chromatogr.* **12**, 441-452.

WHITE T., 1956. The scope of vegetable tannin chemistry in *Symposium The chemistry of vegetale tannins* 7, Soc. Leather Trades Chem. Croydon (G. B.).

WHITE Th., 1958. Chemistry of the Vegetale Tannins in *the Chemistry and Technologie of Leather.* **2**, 98-160.

WHITE Th., KIRBY K., KNOWLES E., 1952. Tannins. IV. The complexity of tannin extract composition. *J. Soc. Leather Trades Chemists.* **36**, 148-155.

WILLIAMS V., TARANOVA P., 1950. Méthode quantitative de détermination des substances colorées du vin rouge (en russe). *Vinodelie i Vinogradarstvo, SSSR*, nº 4, 29-30.

WILLIAMS V., TARANOVA P., 1951. Méthode chromatographique de séparation des substances colorées du vin (en russe). *Vinodelie i Vinogradarstvo, SSSR*, nº 7, 16-18.

WOLLISH E., 1961. Present status of thin layer chromatography. *Microchem. L. Symp. Ser. U.S.A.* **2**, 687-696.

ZAPROMETOV M., SOBOLEVA G., 1954. *C. R. Acad. URSS*, **96**, 1205 (d'après ZAPROMETOV M. 1960).

ZAPROMETOV M., 1960. Dosage des catéchines après leur séparation au moyen de la chromatographie sur papier (en russe) dans *Chromatographie, sa theorie et son utilisation. Travaux du Symposium chromatographique URSS*, 408-416. Ac. Sci. URSS, Moscou.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (4), 377-397.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CONDITIONS DE LA RÉACTIVATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES CRÈMES PASTEURISÉES

DO NGOC-CU, J. LENOIR et R. VEISSEYRE

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Technologie et de Microbiologie, École nationale supérieure agronomique, Grignon (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

Sur des échantillons de crème pasteurisée à haute température (80 à 95°C) pendant des temps courts (15 à 30 secondes) une réactivation de la phosphatase alcaline se manifeste nettement. Les conditions de cette réactivation sont étudiées et discutées. Trois facteurs sont particulièrement déterminants : la température et la durée du chauffage, les conditions de conservation et l'acidité de la crème.

Ainsi, une différence notable dans l'intensité de la réactivation est constatée selon que la pasteurisation est réalisée à 80°C pendant 30 secondes ou à 90°C pendant 20 secondes bien que ces deux modes de chauffage exercent sur la phosphatase alcaline de la crème un effet inactivateur sensiblement équivalent. L'intensité du phénomène est également influencée par la température et la durée de conservation. L'intensité maximum se situe à une température voisine de 30°C. A cette température, la réactivation est déjà très sensible après un temps de conservation de 12 heures. A basse température (4°C ou même 11°C), la réactivation ne se manifeste que très discrètement. Enfin, l'acidité de la crème exerce une action nettement inhibitrice ; lorsqu'elle atteint 4 à 4,5 g d'acide lactique par litre, la réactivation présente une intensité faible ou nulle.

Ces observations ont des incidences pratiques importantes. En effet, les conditions usuelles de traitement industriel des crèmes pasteurisées ne semblent pas favorables à l'apparition du phénomène de réactivation.

I. — INTRODUCTION

L'épreuve de la phosphatase alcaline a été et est encore souvent utilisée en France pour contrôler l'efficacité de la pasteurisation des crèmes. Or, des anomalies ont été signalées dans les résultats obtenus. Des produits, dont la phosphatase a été inactivée par une pasteurisation correctement conduite, présentent parfois, après une conservation de courte durée, une réaction positive. Ces anomalies sont analogues à celles qui ont été signalées sur le lait soumis à un traitement à haute température du type UHT.

De nombreux travaux ont été déjà réalisés en vue de préciser les conditions dans lesquelles apparaît la réactivation de l'enzyme dans le lait et la crème. Les facteurs suivants ont été plus particulièrement étudiés :

— *la teneur en matière grasse* (POSTHUMUS, 1952 ; WRIGHT et TRAMER, 1953 *b*, 1954 ; FRAM, 1957 ; EDDLEMAN et BABEL, 1958).

— *la température et le temps de chauffage* (BROWN et ELLICKER, 1942 ; POSTHUMUS, 1952 ; RITTER, 1953 ; WRIGHT et TRAMER, 1953 *a*, 1953 *b*, 1954 ; WRIGHT, 1956 ; FRAM, 1957 ; EDDLEMAN et BABEL, 1958 ; HANSSON, 1961 ; LYSTER et ASCHAFFENBURG, 1962).

— *la température et le temps de conservation* (BARBER, 1942 ; BROWN et ELLICKER, 1942 ; BARBER et FRAZIER, 1943 ; POSTHUMUS, 1952 ; WRIGHT et TRAMER, 1953 *a*, 1954 ; WRIGHT, 1956 ; SCHOLZ, 1956 ; FRAM, 1957 ; EDDLEMAN et BABEL, 1958 ; PASCHKE, 1958 *a* ; MICKLE, DIAB et OLSON, 1960 ; HANSSON, 1961) ;

— *l'acidité* (SJÖSTRÖM, 1943, 1944 ; PASCHKE, 1958 b ; USSEGLIO-TOMASSET, 1961) ;

— *la présence d'activateurs et d'inhibiteurs* (RITTER, 1953 ; WRIGHT et TRAMER, 1956 ; Rapport READING, 1959 ; MCFARREN et *al.*, 1960 ; HANSSON, 1961 ; LYSTER et ASCHAFFENBURG, 1962).

Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer le processus de la réactivation de la phosphatase. Les uns font appel au développement d'enzymes d'origine microbienne (BROWN, 1940 ; HALLER, BABCOCK et ELLIS, 1941 ; BARBER, 1942 ; BUCK, 1942 ; BARBER et FRAZIER, 1943). Les autres suggèrent des modifications réversibles dans la structure de l'enzyme initiale (WRIGHT et TRAMER, 1953 *b* ; Rapport READING, 1959 ; HANSSON, 1961), la réversibilité pouvant être liée à la présence de certains composés réducteurs (rapport READING, 1959 ; HANSSON, 1961 ; WRIGHT et TRAMER, 1953 *b*). Enfin d'autres chercheurs attribuent le phénomène à la présence d'enzyme résiduelle qui, protégée par la phase grasse, échapperait à l'inactivation thermique et diffuserait dans la crème après pasteurisation (WILEY, NEWMAN et WHITEHEAD, 1941 ; SIMONART et HUBERLANT, 1956).

De tous ces travaux, dont les résultats ne sont pas toujours concordants, il ressort que des incertitudes peuvent planer sur l'interprétation des résultats de l'épreuve de la phosphatase appliquée au contrôle de la pasteurisation de la crème. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'apporter une contribution à la connaissance d'un phénomène dont les prolongements industriels sont importants.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — *Détermination de l'activité phosphatasique*

L'activité phosphatasique est déterminée par la méthode d'ASCHAFFENBURG et MULLEN (1949). Après 2 heures d'incubation à 37°C en présence de paranitrophénylphosphate disodique en solution tamponnée à pH 9,8-10, le mélange crème-substrat est déféqué à l'acide trichloracétique. Le filtrat est alcalinisé et l'intensité de coloration est lue au photomètre de BLET à 425 mμ. L'activité phosphatasique est traduite en μg de paranitrophénol libéré par ml de crème à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Cette courbe a été établie à partir de solutions de paranitrophénol dans la crème pasteurisée 45 mn à 65°C. Nous avons en effet relevé des différences d'intensité de coloration selon que le paranitrophénol est en solution dans l'eau, dans le lait ou dans la crème (fig. 1). Ces différences

s'expliquent vraisemblablement par une fixation d'une partie du colorant sur les matières grasses et les protéines, plus particulièrement semble-t-il sur les matières grasses comme l'indiquent les résultats suivants obtenus avec divers agents de dilution.

Nous avons toutefois constaté que les résultats sont très peu influencés par la richesse en matière grasse de l'agent de dilution lorsque celle-ci varie de 35 à 55 p. 100.

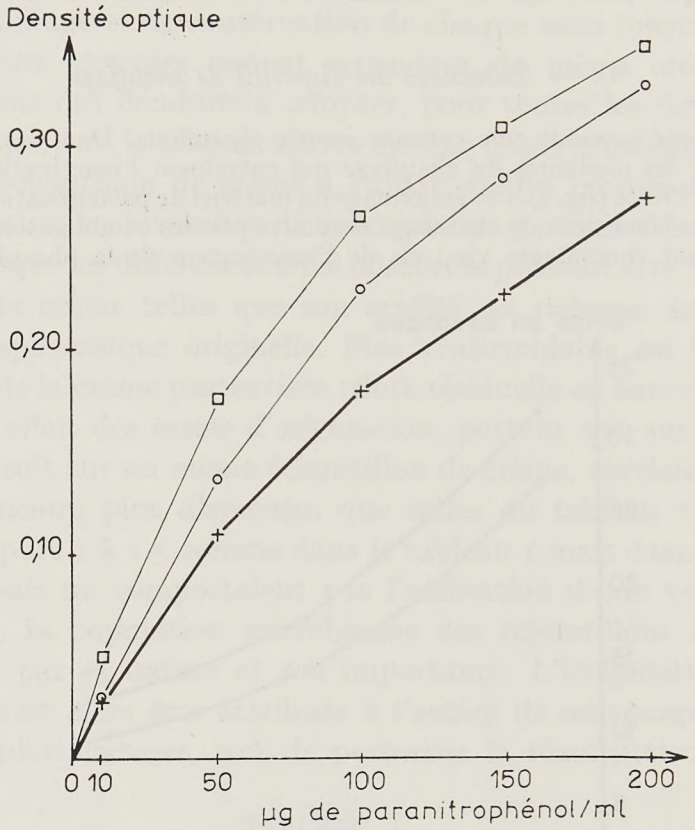


FIG. 1. — *Courbe étalon pour le dosage du paranitrophénol*

Influence de l'agent de dilution sur l'intensité de coloration du paranitrophénol en milieu alcalin : paranitrophénol en solution dans la crème +——+
dans le lait ○——○
dans l'eau □——□

En abscisses : concentration en paranitrophénol exprimée en µg/ml.
En ordonnées : Intensité de coloration exprimée en densité optique.

Agents de dilution	Densité optique (Solution à 50 µg de paranitrophénol par ml.)
Eau	0,16
Lait écrémé	0,15
Lait entier	0,14
Crème	0,11

B. — *Dispositif expérimental*

La crème fraîche, contenant 40-50 p. 100 de matière grasse et provenant du lait de mélange de 50 vaches de race *Française Frisonne Pie-Noire* de la ferme expérimentale de Grignon, est placée dans des tubes stériles de verre mince calibrés (4 mm de diamètre intérieur). Un préchauffage est réalisé en plongeant les tubes pendant 5 minutes dans un bain-marie réglé à 50°C. Ce préchauffage

n'entraîne aucune diminution de l'activité phosphatasique de l'échantillon. La pasteurisation est ensuite effectuée par immersion des tubes, pendant un temps déterminé, dans un second bain-marie réglé à la température choisie. Ensuite, les tubes sont immédiatement plongés dans un bain d'eau glacée.

Le contenu de chaque tube (environ 3 ml) est alors introduit aseptiquement dans un tube à essai stérile de 16 × 160 et maintenu à la température choisie pendant un temps déterminé. Après incubation, l'activité phosphatasique de l'échantillon est déterminée sur une prise d'essai de 2 ml.

C. — *Étalonnage du dispositif de chauffage*

Le dispositif adopté présente une certaine inertie thermique. Dans les conditions précisées, nous avons déterminé les modalités du chauffage qui entraînent l'inactivation de la phosphatase alcaline du lait et de la crème (fig. 2). Cet étalonnage du matériel de pasteurisation a permis d'adopter, au cours des essais, des conditions de chauffage, traduites par des combinaisons température-temps, d'efficacité sensiblement équivalente vis-à-vis de l'inactivation de la phosphatase.

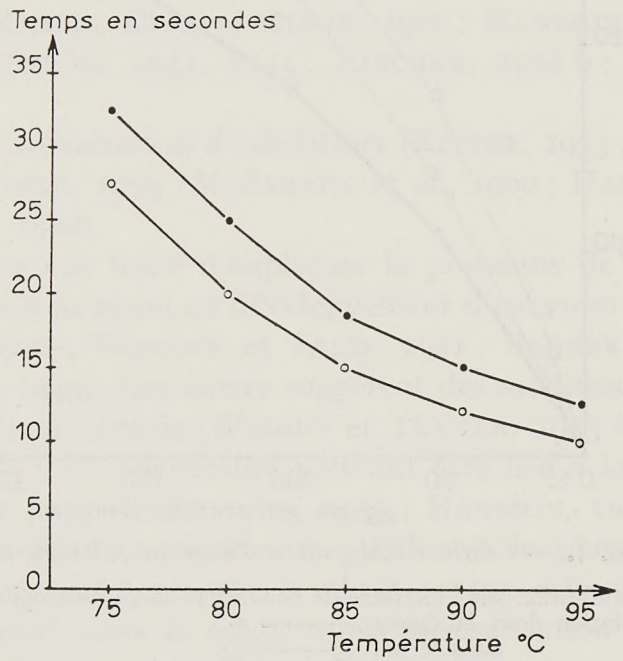


FIG. 2. — *Courbes d'inactivation thermique de la phosphatase alcaline*

dans le lait ○——○
dans la crème ●——●

Le dispositif expérimental est le suivant : le produit est placé dans des tubes de verre de 4 mm de diamètre intérieur, préchauffé au bain-marie à 50°C, puis porté à la température choisie pendant un temps déterminé par immersion dans un bain-marie réglé à cette température ; le contenu des tubes est ensuite immédiatement refroidi par immersion dans un bain d'eau glacée.

En abscisses : température du bain de chauffage en degrés C.
En ordonnées : temps d'immersion dans le bain en secondes.

III. — RÉSULTATS

A. — *Reproductibilité et intensité du phénomène*

Une étude des facteurs qui conditionnent la réactivation ne peut être interprétée que si l'intensité du phénomène est reproductible.

En vue d'apprécier la reproductibilité des résultats, quatre échantillons de crème, récoltés à des jours différents, sont pasteurisés 20 secondes à 90°C, puis conservés 3 jours à 30°C. Sur chaque échantillon, dix essais sont réalisés dans les conditions

expérimentales définies. Le tableau I groupe les résultats : intensité moyenne de réactivation, caractéristiques de dispersion, valeur probable de la moyenne calculée selon la méthode STUDENT-FISHER.

Ces données montrent que, pour un même échantillon de crème, les intensités de réactivation présentent, d'un essai à l'autre, une certaine dispersion bien que les conditions de chauffage et de conservation de chaque essai soient rigoureusement identiques ; les valeurs trouvées restent cependant du même ordre de grandeur. Ces constatations nous ont conduits à adopter, pour toutes les déterminations, un mode opératoire comportant la mise en œuvre de cinq essais consécutifs. On remarque en outre que, d'un échantillon de crème à l'autre, toutes conditions de traitement étant par ailleurs égales, les intensités de réactivation sont sensiblement différentes.

Il ne semble pas que les différences ainsi observées puissent être reliées à certaines caractéristiques de la crème telles que son acidité, sa richesse en matière grasse ou son activité phosphatasique originelle. Plus vraisemblable est l'intervention de la flore microbienne de la crème pasteurisée : flore résiduelle ou flore de contamination post-opératoire. En effet, des essais d'orientation, portant soit sur des échantillons de crème différents, soit sur un même échantillon de crème, révélaient des intensités de réactivation beaucoup plus dispersées que celles du tableau I. Elles variaient non plus dans le rapport 1 à 1,5 comme dans le tableau I mais dans le rapport 1 à 5. Or, ces premiers essais ne comportaient pas l'utilisation d'une verrerie stérile et, dans ces conditions, la population microbienne des échantillons à l'essai pouvait être assez différente par sa nature et son importance. L'irrégularité des intensités de réactivation pouvait alors être attribuée à l'action de microorganismes capables soit d'élaborer des phosphatases, soit de perturber la réactivation de l'enzyme.

TABLEAU I

Reproductibilité et intensité de la réactivation de la phosphatase alcaline
(Activités phosphatasiques exprimées en µg de paranitrophénol par ml de crème)

Échantillon N°	Caractéristiques de la crème crue			Intensité de réactivation			
	Acidité (g d'acide lactique par litre)	Matière grasse (g pour 100 g)	Activité phosphatasique (dilution au 1/50)	Moyenne M	Écart-type	Coefficient de variation	M probable *t* (95)
I	1,6	53	210	338	84,6	0,25	279-397
II	1,3	42	140	170	25	0,14	154-186
III	1,4	55	170	253	28,1	0,11	235-271
IV	1,4	51	125	315	44,3	0,14	283-347

L'élaboration de phosphatases par la flore résiduelle de la crème pasteurisée (essentiellement constituée par des *Bacillus*, des *Micrococcus* et quelques bactéries lactiques) ne semble pas devoir être retenue. En effet, les essais comportant l'ense-

mencement d'une crème stérilisée, 20 minutes à 120°C, avec une culture sur lait de la flore d'une crème pasteurisée, 30 secondes à 90°C, ont toujours conduit à des activités phosphatasiques nulles ou très faibles, même après des durées d'incubation de 10 jours à 30°C (tabl. 2).

TABLEAU 2

Activité phosphatasique de la microflore résiduelle de la crème pasteurisée
(Activités exprimées en µg de paranitrophénol par ml de crème)

		Temps d'incubation				
		0	24 h	3 j	7 j	10 j
I	Témoin stérile	0	1	1	1	1
	Ensemencement 1 %	1	1,5	1	2,5	2,5
	Ensemencement 10 %	0,5	2	1	3,5	3
II	Témoin stérile	0	1	0	2	3
	Ensemencement 1 %	0	2	6	5	6
	Ensemencement 10 %	0	2	6	2	4

L'hypothèse de la perturbation de la réactivation par l'action des microorganismes a été vérifiée en inhibant le développement microbien dans la crème pasteurisée au cours de sa conservation. A cet effet, nous avons essayé divers antibiotiques, seuls ou associés. En accord avec des travaux antérieurs (WRIGHT et TRAMER, 1953 *a*) nous avons constaté que le phénomène de la réactivation n'est nullement contrarié par cette addition. En outre, les résultats obtenus sur plusieurs échantillons d'une même crème sont nettement plus groupés en présence d'antibiotiques ; les activités phosphatasiques résultant de la réactivation ne variant plus que dans les limites de 1 à 1,5. L'influence de l'activité microbienne sur l'intensité de la réactivation pourrait alors s'expliquer soit par le caractère protéolytique des germes présents qui seraient susceptibles de dégrader l'élément protéique de la phosphatase (SANDERS et SAGER, 1949), soit par leur caractère acidifiant, un pH bas inhibant sensiblement la réactivation de l'enzyme (SJÖSTRÖM, 1943, 1944).

Nous n'avons cependant pas retenu, pour l'ensemble des essais, cette addition d'antibiotique afin de nous placer dans des conditions de milieu aussi proches que possible de celles de la pratique. Toutefois, afin d'éviter l'interférence de la flore de contamination post-opératoire, responsable en majeure partie de l'irrégularité des premiers résultats, nous avons utilisé du matériel stérile. Nous avons ainsi réduit notablement (tabl. 1) la dispersion des résultats. La répétition en quintuple de tous les essais devait en outre nous procurer une sécurité suffisante pour aborder l'étude des conditions de la réactivation.

L'intensité du phénomène de réactivation apparaît déjà à l'examen des chiffres du tableau 1. Elle peut être appréciée encore plus clairement si l'on compare les activités de la phosphatase originelle dans le lait et dans la crème à l'activité de la

phosphatase « réactivée » dans la crème pasteurisée 20 secondes à 90°C et conservée 3 jours à 30°C (fig. 3). On remarque que cette activité est sensiblement égale au 1/10 de l'activité phosphatasique du lait cru. L'intensité du phénomène peut donc atteindre des valeurs très notables.

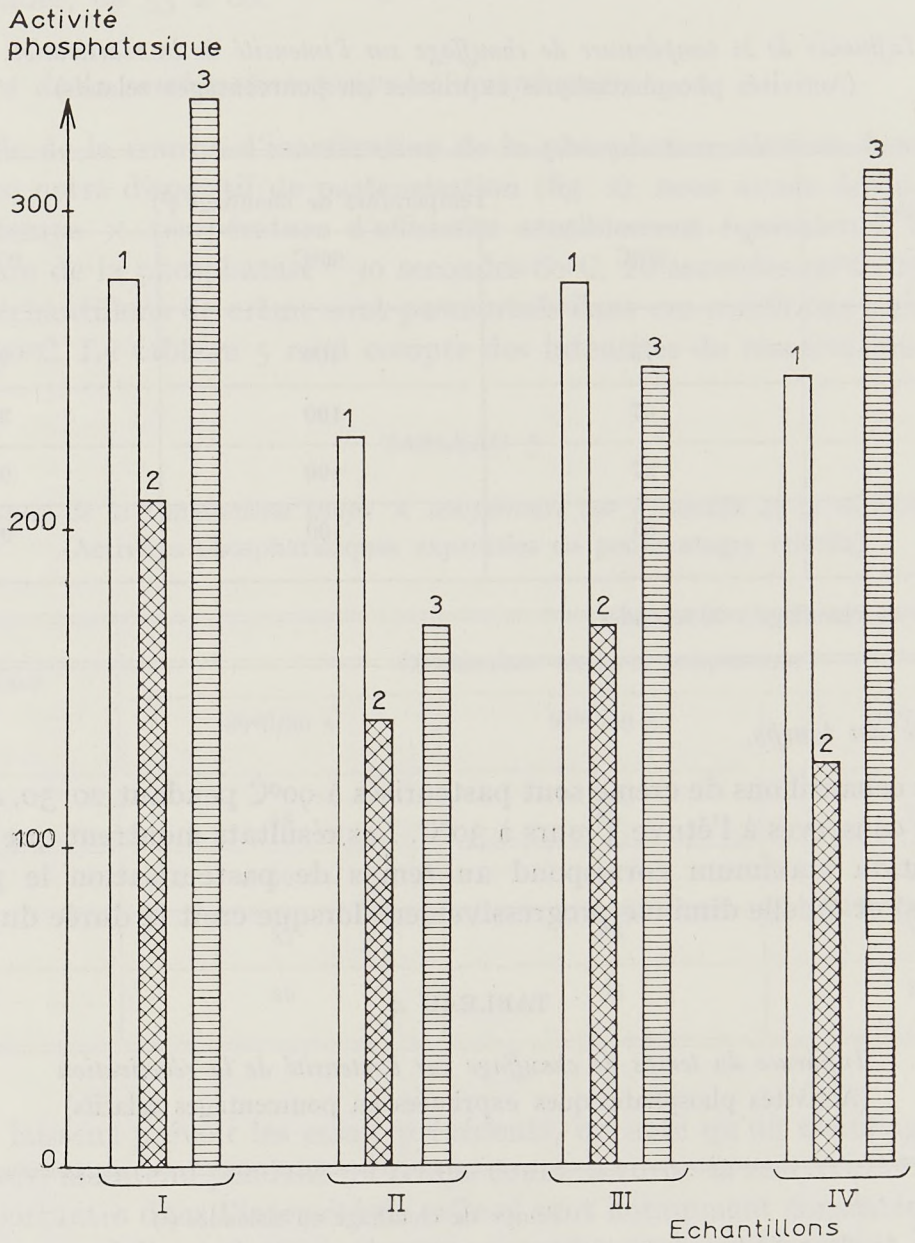


FIG. 3. — *Activités comparées de la phosphatase alcaline originelle et de l'enzyme « réactivée »*
Activité phosphatasique exprimée en µg de paranitrophénol libéré par ml de produit.
1 : lait cru dilué au 1/10.
2 : crème crue diluée au 1/50.
3 : crème pasteurisée 20 secondes à 90°C et conservée 3 jours à 30°C.

B. — *Influence des conditions de chauffage.*

1° *Influence de la température.*

Quatre échantillons de crème sont portés pendant 30 secondes aux températures de 80, 90 et 95°C, puis incubés 3 jours à 30°C. Les résultats, exprimés en pourcentages relatifs d'activité phosphatasique dans le tableau 3, montrent que les intensités

de réactivation sont maxima et sensiblement égales après pasteurisation aux températures de 90 et 95°C. A la température de 80°C, correspond une intensité de réactivation nettement moins élevée. Toutefois, l'amplitude des variations est différente d'un échantillon à l'autre.

TABLEAU 3

Influence de la température de chauffage sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en pourcentages relatifs)

Échantillon N°	Température de chauffage (1)		
	80°C	90°C	95°C
I	75	100	97
II	67	100	99
III	57	100	96
IV	85	100	96

(1) Temps de chauffage : 30 secondes.

2° *Influence du temps.*

Quatre échantillons de crème sont pasteurisés à 90°C pendant 20, 30, 40 et 60 secondes puis conservés à l'étuve 3 jours à 30°C. Les résultats montrent que l'intensité de réactivation maximum correspond au temps de pasteurisation le plus court (20 secondes) et qu'elle diminue progressivement lorsque croît la durée du chauffage

TABLEAU 4

Influence du temps de chauffage sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en pourcentages relatifs)

Échantillon N°	Temps de chauffage en secondes (1)			
	20	30	40	60
I	100	89	78	67
II	100	82	68	65
III	100	93	76	68
IV	100	73	58	53

(1) Température de chauffage : 90°C.

(tabl. 4). Là encore on relève, d'un échantillon à l'autre et pour des traitements identiques, des pourcentages relatifs d'activité inégaux. Si on affecte à l'intensité de réactivation maximum (temps 20 secondes) la valeur 100, on note, pour un temps de pasteurisation de 30 secondes, des valeurs variant de 73 à 93 et, pour un temps de 60 secondes, de 53 à 68.

3° *Influence de la combinaison temps × température.*

A l'aide de la courbe d'inactivation de la phosphatase alcaline dans la crème, établie avec notre dispositif de pasteurisation (fig. 2), nous avons défini trois combinaisons temps × température d'efficacité sensiblement équivalente vis-à-vis de l'inactivation de la phosphatase : 30 secondes-80°C, 20 secondes-90°C, 15 secondes-95°C. Les échantillons de crème sont pasteurisés dans ces conditions puis conservés 3 jours à 30°C. Le tableau 5 rend compte des intensités de réactivation observées.

TABLEAU 5

Influence de la combinaison temps × température sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en pourcentages relatifs)

Échantillon N°	Combinaison temps × température		
	80°C/30 s	90°C/20 s	95°C/15 s
I	58	105	100
II	59	76	100
III	47	85	100
IV	49	94	100

Comme le laissent prévoir les essais précédents, on note qu'un chauffage à température élevée, maintenu pendant un temps court, favorise la réactivation. Des différences importantes dans l'intensité de celle-ci sont notamment constatées selon que le chauffage est réalisé à 80°C pendant 30 secondes ou à 90°C pendant 20 secondes et 95°C pendant 15 secondes. Ces deux dernières combinaisons s'accompagnent d'intensités de réactivation voisines.

C. — *Influence des conditions de conservation*

1° *Influence de la température.*

Après pasteurisation 20 secondes à 90°C, cinq échantillons de crème sont conservés pendant trois jours aux températures suivantes 3-4°C, 10-12°C, 20°C, 30°C et 37°C. Le tableau 6 rend compte des résultats. On remarque que la réactivation est très faible, sinon nulle, après incubation aux températures de 3-4°C et de 10-12°C.

TABLEAU 6

Influence de la température de conservation sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en pourcentages relatifs)

Échantillon N°	Température de conservation (1)				
	4°C	11°C	20°C	30°C	37°C
I	0,8	2,3	19	100	86
II	1,0	2,3	19,6	100	81
III	0,4	1,4	16	100	110
IV	1,8	1,9	37,5	100	68
V	1,8	2,1	16,6	100	80

(1) Temps de conservation : 3 jours.

A ces températures, l'activité phosphatasique développée après 3 jours de conservation ne peut être considérée comme significative, les quantités de paranitrophénol libéré étant inférieures à 10 µg par ml de crème. A 20°C, par contre, une activité phosphatasique notable (50 à 75 µg/ml) se développe dans la crème pasteurisée. Toutefois, c'est à 30°C et 37°C que l'intensité de la réactivation atteint les valeurs les plus importantes, le maximum se situant aux environs de 30°C.

TABLEAU 7

Influence du temps de conservation sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en pourcentages relatifs)

Échantillon N°	Temps de conservation à 30°C				
	0 h	12 h	21 h	44 h	3 jours
I	0	23	44	60	100
II	0,5	32	37	75	100
III	1,3	33	57	79	100
IV	1,4	22	32	66	100
V	0	27	58	78	100

2° *Influence du temps.*

Cinq échantillons de crème sont pasteurisés 20 secondes à 90°C puis conservés à la température de 30°C pendant 12 heures, 21 heures, 44 heures et 3 jours. On constate une augmentation progressive et assez régulière de l'intensité de réactivation qui atteint déjà des valeurs appréciables et significatives (50 à 75 µg de paranitrophénol par ml) après 12 heures d'incubation (tabl. 7).

D. — *Influence de l'acidité*

Les essais précédents montrent que les combinaisons temps-température appliquées dans l'industrie peuvent permettre une réactivation notable de la phosphatase dans les crèmes pasteurisées. Cependant, nos conditions expérimentales ne s'identifient pas aux modalités usuelles de traitement industriel des crèmes. Celui-ci comporte, après pasteurisation, un ensemencement des crèmes avec un levain lactique, puis une maturation. Il s'ensuit une acidification du milieu qui passe de 1-1,2 g à 3,5-4 g d'acide lactique par litre. Or, l'on sait que l'acidité exerce une influence sur la réactivation de l'enzyme (Paschke, 1958 *b* ; Usseglio-Tomasset, 1961).

Ce facteur peut agir selon deux processus différents. Il peut soit modifier l'activité de la phosphatase alcaline, originelle et « réactivée », soit perturber le mécanisme de la réactivation.

1° *Influence sur l'activité de la phosphatase alcaline originelle.*

Le pH optimum d'activité de l'enzyme est compris entre 9,8 et 10 (Sanders, 1949). En faisant varier le pH du tampon, nous avons constaté que l'activité phosphatasique d'une crème crue fraîche présente un maximum entre pH 9,6 et pH 10 et que, de part et d'autre de cette zone de pH, l'activité enzymatique est fortement réduite (fig. 4).

L'acidité du milieu peut donc intervenir en réglant le pH du mélange réactionnel à une valeur inférieure à cet optimum lors de l'incubation. Pour éliminer cette cause d'erreur il importait de vérifier qu'une acidité même élevée de la crème, ne modifie pas le pH du mélange, ou ne le modifie que dans une faible mesure, sans effet appréciable sur l'activité de la phosphatase. La figure 5 montre que, si l'acidité de la crème dépasse 4 g d'acide lactique par litre, le pH du mélange réactionnel est inférieur à 9,6. En mettant en œuvre des crèmes titrant 4 à 6 g d'acide lactique par litre, on peut donc prévoir qu'une fraction seulement de l'activité phosphatasique réelle sera mise en évidence, fraction d'autant plus faible que l'acidité est plus élevée. Pour réaliser, dans ces conditions, une détermination correcte, on peut soit modifier la composition du tampon, soit tenir compte des variations d'activité phosphatasique en fonction du pH du mélange. C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée, compte tenu du faible nombre d'échantillons présentant une acidité supérieure à 4 g d'acide lactique par litre.

L'influence de l'acidité du milieu peut aussi se manifester directement. Divers travaux ont en effet mentionné une inhibition de l'activité phosphatasique dans les laits ou les crèmes acides (Bergman, 1941 ; Sjöström, 1943, 1944). Deux facteurs

peuvent être à l'origine de cette inhibition : l'acidité et le temps pendant lequel elle exerce son action.

Afin de vérifier l'incidence éventuelle de ces deux facteurs nous avons pris quatre échantillons de crème crue différents A, B, C, D. Chaque échantillon, dilué au

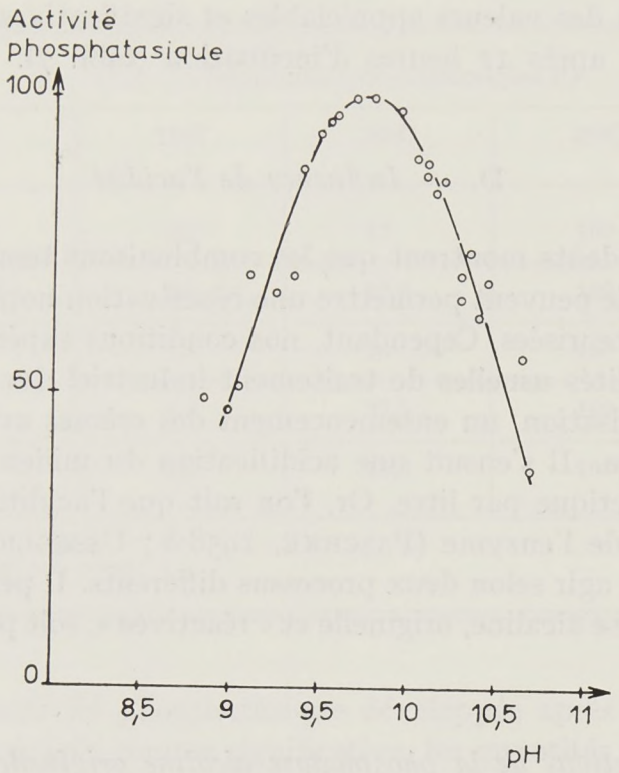


FIG. 4. — *Influence du pH sur l'activité de la phosphatase alcaline originelle*

En abscisses : pH du mélange réactionnel.

En ordonnées : activité phosphatasique exprimée en pourcentage relatif de paranitrophénol libéré par ml de crème.

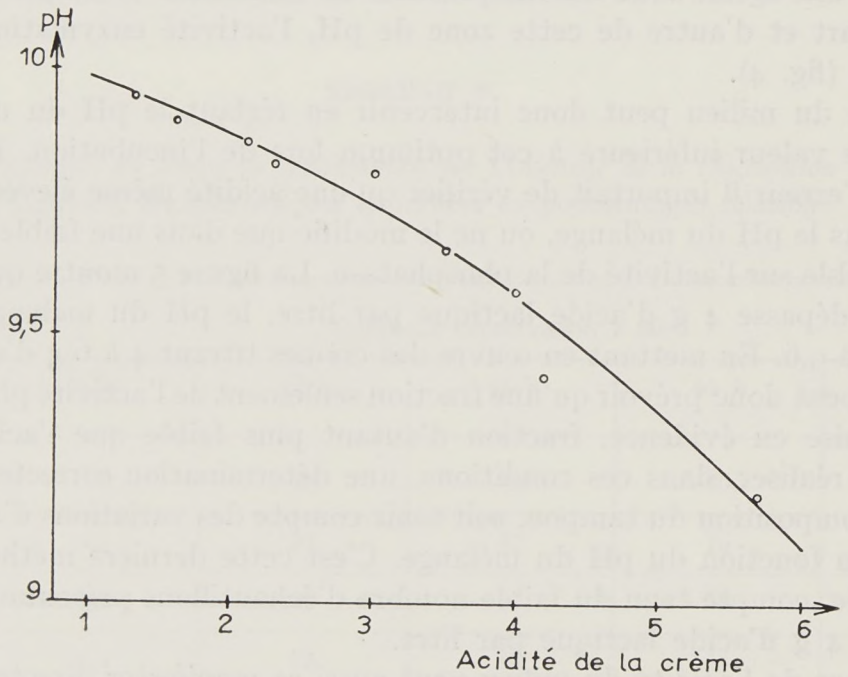


FIG. 5. — *Influence de l'acidité de la crème sur le pH du mélange réactionnel*

En abscisses : acidité exprimée en grammes d'acide lactique par litre.

En ordonnées : pH du mélange réactionnel.

Note. Lire le point manqant sur le graphique, dont les ordonnées sont : pH 9,40 et acidité 5.

1/50 avec une crème de même origine dont la phosphatase a été inactivée par chauffage à 65°C pendant 45 minutes, est réparti en cinq lots. Le premier constitue le témoin, les quatre autres sont acidifiés par addition de doses variables d'acide lactique. L'activité phosphatasique est déterminée sur chacun des lots au temps 0 et après 30 minutes, 2 heures, 6 heures et 21 heures de conservation à la température de 20°C.

Les résultats exprimés en pourcentages relatifs d'activité, sont groupés dans le tableau 8. Les constatations suivantes peuvent être faites.

— Une acidité élevée (5 à 6 g d'acide lactique par litre) maintenue pendant un temps très court n'entraîne qu'une faible diminution de l'activité phosphatasique. Cette diminution ne paraît pas s'amplifier lorsque l'acidité croît.

— Pour une acidité donnée, le contact prolongé entre la crème et l'acide est à l'origine d'une inhibition marquée de l'activité phosphatasique originelle, inhibition d'autant plus nette que le contact est plus long.

— Pour un temps de contact donné, l'augmentation de l'acidité s'accompagne d'une inactivation progressive de l'enzyme.

TABLEAU 8

Influence de l'acidification de la crème sur l'activité de la phosphatase alcaline originelle
(Activités exprimées en p. 100 de l'activité initiale)

Échantillons	Acidité (g d'acide lactique par litre)	Temps de contact				
		0	30 mn	2 h	6 h	21 h
A	1,2	100	98	80	71	70
	2,4	93	87	73	70	61
	3,5	86	78	55	37	11
	4,3	85	74	43	12	2
	4,9	68	61	16	3	1
B	1,3	100	101	83	97	92
	1,9	95	99	80	93	86
	3,4	86	81	71	73	62
	4,4	83	79	60	18	5
	5,9	89	73	30	1	0
C	1,4	100	96	70	70	71
	2,8	84	82	60	60	59
	3,6	83	68	43	31	16
	5,1	96	70	19	4	2
	5,8	82	35	—	0,5	1
D	1,2	100	98	80	74	74
	2,6	96	93	73	62	62
	3,8	93	80	52	29	14
	5,1	81	64	15	1	3
	6,7	94	45	1	0,2	0,5

Il apparaît ainsi que l'acidité n'intervient, pour modifier notablement l'activité de la phosphatase, que si son action sur le milieu est maintenue pendant un temps assez long. Dans l'étude de ce facteur il convient donc d'envisager la combinaison

acidité × temps et non l'acidité seule. On remarque que son influence sur l'activité enzymatique est particulièrement sensible. Une acidité supérieure ou égale à 4 g d'acide lactique par litre, maintenue pendant 2 heures ou plus, entraîne une réduction de cette activité de plus de 50 p. 100 de la valeur initiale. Lorsque l'acidité atteint une valeur proche de 5 g d'acide lactique par litre, l'activité phosphatasique de la crème crue diluée devient très faible, sinon nulle (moins de 20 µg de paranitrophénol libéré par ml) après un temps de contact de 6 heures ou plus.

Cette inactivation de la phosphatase par l'acidité pourrait s'expliquer par une modification du support protéique de l'enzyme.

2° *Influence sur l'activité de la phosphatase alcaline « réactivée ».*

Le comportement de la phosphatase « réactivée » vis-à-vis de l'acidité doit s'identifier à celui de la phosphatase originelle si, comme certains travaux le suggèrent, elles sont l'une et l'autre de même nature (WRIGHT et TRAMER, 1953 *a*).

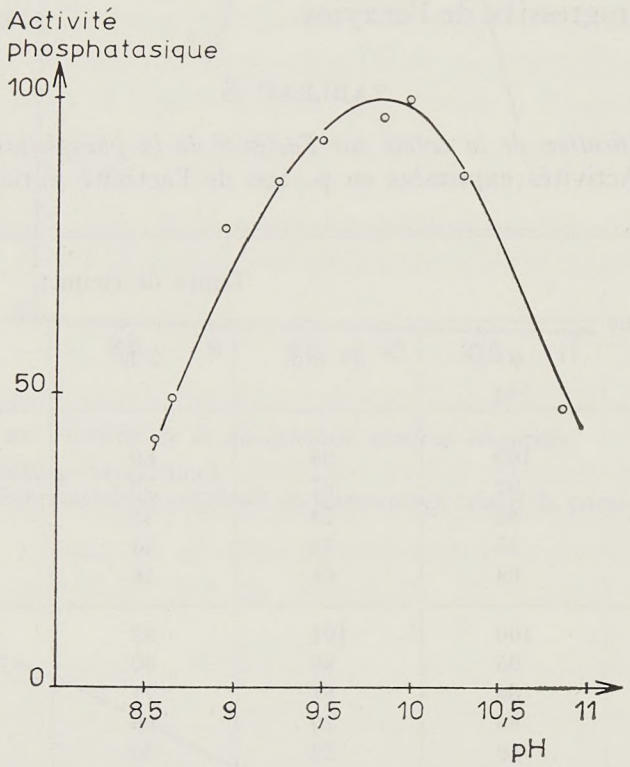


FIG. 6. — *Influence du pH sur l'activité de la phosphatase alcaline « réactivée »*
En abscisses : pH du mélange réactionnel.
En ordonnées : activité phosphatasique exprimée en pourcentage relatif de paranitrophénol libéré par ml de crème pasteurisée 20 secondes à 90°C et conservée 3 jours à 30°C.

Nous avons cependant vérifié l'influence du pH du mélange réactionnel sur l'activité de l'enzyme « réactivée ». A cet effet nous avons mis en œuvre des échantillons de crème pasteurisés 20 secondes à 90°C et conservés 3 jours à 30°C. La courbe obtenue (fig. 6) présente la même allure que celle relative à la phosphatase originelle, elle montre que la zone de pH optimum d'activité est également comprise entre 9,6 et 10.

Afin de mettre en évidence l'influence de l'acidité et du temps de contact entre l'acide et le milieu, sur l'activité de la phosphatase « réactivée », nous avons procédé comme suit :

Les quatre échantillons de crème A, B, C, D sont pasteurisés 20 secondes à 90°C

et conservés 3 jours à 30°C. Chaque échantillon est réparti en quatre lots. Le premier constitue le témoin, les trois autres sont acidifiés par addition d'acide lactique. L'activité phosphatasique est déterminée sur chacun des lots aux temps 0, 30 minutes, 2 heures, 6 heures et 21 heures.

Le tableau 9 rend compte des résultats obtenus. Bien que ceux-ci présentent une certaine irrégularité, il s'en dégage néanmoins des conclusions du même ordre que celles énoncées ci-dessus. L'acidité est, avec le temps, un facteur d'inhibition important de la phosphatase « réactivée ».

TABLEAU 9

Influence de l'acidification sur l'activité de la phosphatase alcaline « réactivée »
(Activités exprimées en p. 100 de l'activité initiale)

Échantillons	Acidité (g d'acide par litre)	Temps de contact				
		0	30 mn	2 h	6 h	21 h
A	2,2	100	94	91	96	100
	3,0	108	104	103	104	107
	3,8	109	106	94	67	70
	5,1	116	88	47	5	2
B	1,7	100		66	96	105
	3,5	100		67	55	32
	4,6	56		26	22	12
	5,5	30		10	11	9
C	1,5	100	103	90	123	126
	2,6	92	125	116	157	159
	3,6	101	114	88	97	90
	4,3	16	11	4	3	4
D	1,8	100	99	102	110	175
	2,8	104	106	84	85	88
	3,8	98	92	69	60	40
	5,6	59	54	21	16	8

3° — *Influence de l'acidité de la crème pasteurisée sur l'intensité de réactivation.*

Il convient maintenant de contrôler l'incidence de l'acidification sur le processus même de la réactivation. Deux méthodes sont utilisées, l'une comporte l'addition d'acide lactique, l'autre l'ensemencement de la crème pasteurisée en ferments lactiques.

a) *Acidification par addition d'acide lactique.* — Dans une première série d'essais, l'acidification est réalisée par addition en une seule fois et immédiatement après pasteurisation d'une dose déterminée d'acide lactique à la crème pasteurisée (20 secondes, 90°C). La crème acidifiée et le témoin sont ensuite conservés à 30°C. L'activité de la phosphatase « réactivée » est mesurée après un temps variable de conservation (tabl. 10). On remarque qu'une acidification même légère entraîne un abaissement marqué de l'intensité de réactivation.

Dans une seconde expérience, l'acidification est réalisée graduellement. Après pasteurisation (20 secondes, 90°C) l'échantillon est réparti en différents lots. Un de ces lots sert de témoin ; les autres sont acidifiés après avoir séjourné pendant des temps différents à 30°C : 6 heures, 18 heures, 27 heures et 42 heures.

TABLEAU 10

Influence de l'acidification par addition d'acide lactique sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en p. 100 de l'activité du témoin)

Essai N°	Acidité (g d'acide lactique par litre).		Temps de conservation à 30°C	
	Initiale.	Après incubation	21 h	48 h
I	1,0	1,2	100	
	2,0	2,2	12	
	3,0	3,1	5	
II	1,7	2,1	100	
	3,8	4,8	3	
III	1,0	2,2		100
	1,5	2,2		42
	2,0	2,5		9

TABLEAU 11

Influence d'une acidification graduelle par addition d'acide lactique sur l'intensité de la réactivation
(Activités phosphatasiques exprimées en µg de paranitrophénol par ml de crème)

	Temps de conservation					
	0	6 h	18 h	27 h	42 h	50 h
Témoin	(1,1) (1) 4	(1,1) 50	(1,2) 105	(1,2) 120	(1,8) 180	(1,9) 250
1re Acidification		(2,2) 75	(2,3) 80			
2e Acidification			(3,5) 34	(3,6) 2		
3e Acidification				(4,5) 0	(5,1) 1	
4e Acidification					(6,1) 1	(5,8) 0

(1) Les chiffres placés entre parenthèses représentent l'acidité de la crème exprimée en grammes d'acide lactique par litre.

Les caractéristiques de l'essai (acidité et temps de conservation) et les activités phosphatasiques correspondantes sont mentionnées dans le tableau 11. L'absence d'acidification au temps zéro a permis à la réactivation de s'amorcer mais celle-ci est rapidement inhibée par l'action de l'acide lactique. Pour une acidité finale de 3,5 g d'acide lactique par litre atteinte en 18 heures et maintenue pendant 9 heures, l'activité phosphatasique devient nulle.

Peut-on avancer pour autant que l'acidification bloque le mécanisme de la réactivation ? Compte tenu de l'action inhibitrice de l'acidité sur l'activité de l'enzyme originelle ou « réactivée », il n'est guère possible de se prononcer avec certitude sur ce point.

b) *Acidification par ensemencement en ferments lactiques.* — Une crème pasteurisée (20 secondes à 90°C) est ensemencée avec une culture de 24 heures d'une souche de streptocoque lactique. La crème ensemencée et le témoin sont conservés à 30°C. L'activité de la phosphatase est déterminée après les temps de conservation 0, 6 heures, 21 heures, 30 heures et 45 heures. Les résultats (tabl. 12) confirment les observations précédentes concernant l'effet inhibiteur de l'acidification.

TABLEAU 12

Influence de l'acidification par ensemencement en ferments lactiques sur l'intensité de la réactivation

(Activités phosphatasiques exprimées en µg de paranitrophénol par ml de crème)

N° Essai	Taux d'ensemencement	Temps de conservation				
		0	6 h	21 h	30 h	45 h
I	Témoin	(1,2) (1) 2	(1,5) 24	(1,5) 46	(1,5) 52	(1,5) 100
	1 %	(1,3) 4	(1,7) 29	(2,5) 27	(2,7) 26	(3,3) 23
II	Témoin	(1,8) 5	(1,9) 36	(1,9) 91	(2,0) 91	(2,1) 161
	3 %	(2,0) 5	(2,2) 23	(3,0) 19	(3,3) 9	(3,7) 12

(1) Les chiffres placés entre parenthèses représentent l'acidité de la crème exprimée en grammes d'acide lactique par litre.

IV. — DISCUSSION

Sous certaines conditions, le phénomène de la réactivation de la phosphatase alcaline dans les crèmes pasteurisées HTST se manifeste régulièrement et présente une intensité très appréciable. Le contrôle de la pasteurisation des crèmes par

l'épreuve de la phosphatase risque alors d'être peu probant, voire même sans valeur, si certaines précautions ne sont pas observées.

Bien que l'intensité de la réactivation soit variable d'un échantillon de crème à l'autre et, pour un même échantillon, d'un essai à l'autre, alors que les conditions de traitement thermique et de conservation sont identiques, il est possible de mettre en évidence l'action de certains facteurs sur le phénomène.

Ainsi, les conditions de chauffage, température et temps, peuvent être à l'origine de différences sensibles dans les intensités de réactivation. On sait que le phénomène ne se manifeste pas dans les crèmes ayant subi une pasteurisation à basse température, 30 minutes à 63°C, (Brown et Ellicker, 1942 ; Ritter, 1953 ; Eddleman et Babel, 1958) ou 6 minutes à 66°C (Posthumus, 1952). Par contre, une nette réactivation apparaît dans les crèmes pasteurisées à une température supérieure ou égale à 75°C (Eddleman et Babel, 1958).

Nous avons constaté que, pour une température donnée, l'intensité de la réactivation diminue lorsque le temps de chauffage augmente. Dans ces conditions, l'hypothèse selon laquelle la réactivation ne serait qu'une libération de phosphatase protégée paraît plausible (Simonart et Huberlant, 1956).

Toutefois, nous avons également noté que, pour un même temps de chauffage, l'intensité de la réactivation croît lorsque la température augmente et passe de 80 à 90 ou 95°C. Cette observation qui a été faite également sur le lait (Wright et Tramer, 1954 ; Hansson, 1961), n'est guère compatible avec l'hypothèse précédente qui identifie la phosphatase « réactivée » à une fraction protégée de l'enzyme originelle. Il paraît alors plus vraisemblable d'admettre une modification réversible de la structure de l'enzyme et l'intervention, dans le phénomène de réactivation, de groupements SH libres (Rapport Reading, 1959 ; Hansson, 1961), groupements qui n'apparaissent que par l'action d'un chauffage à température élevée sur les protéines.

Si l'on fait varier la température et le temps de chauffage, de telle sorte que l'efficacité thermique des traitements vis-à-vis de l'inactivation de la phosphatase soit sensiblement équivalente, on observe que l'intensité de la réactivation maximum correspond à une pasteurisation à haute température maintenue pendant un temps très court. Ce résultat est en accord avec les conclusions de travaux antérieurs effectués sur le lait. Dans ce produit, la réactivation ne se manifeste que si la pasteurisation est conduite à une température au moins égale à 85-90°C (Fram, 1957 ; Eddleman et Babel, 1958) et surtout si le traitement est du type « UHT » (Wright et Tramer, 1953 *a*, 1953 *b*, 1954).

Les conditions de conservation, notamment la température et le temps, influent également sur l'intensité de la réactivation. La température optimale est voisine de 30°C et ce résultat concorde avec des observations antérieures (Fuchs, 1953 ; Hansson, 1961). A 20°C, on constate encore un développement sensible de l'activité phosphatasique. Par contre, à 3-4°C et même 10°C, on ne décèle que des intensités de réactivation très faibles et sans grande signification après 3 jours de conservation. Signalons cependant que certains travaux mentionnent une réactivation même après conservation à basse température pendant 24-48 heures (Barber, 1942 ; Brown et Ellicker, 1942 ; Barber et Frazier, 1943 ; Eddleman et Babel, 1958). Nos essais et ceux de Paschke (1958 *a*, 1958 *b*) nous permettent néanmoins de conclure que l'épreuve de la phosphatase sur crème pasteurisée n'a de valeur que si elle est réalisée immédiatement après le chauffage ou si l'échantillon à tester est conservé à basse

température (moins de 10°C) pendant un temps court. Des précautions du même ordre sont d'ailleurs indispensables pour le contrôle des laits pasteurisés UHT (Basille, 1962).

Le facteur acidité semble particulièrement déterminant. Si, en effet, la réactivation se développe rapidement et avec une intensité marquée lorsque la crème est peu acide, une acidification du milieu inhibe très nettement et même, si elle est assez forte, totalement le phénomène.

Les résultats obtenus ne permettent pas d'expliquer le mécanisme d'action de l'acidité sur la réactivation. On ne peut dire que l'acidité empêche la réactivation de se produire car ce facteur agit sur l'activité même de l'enzyme (Brown, 1940 ; Bergman, 1941) qui diminue avec le temps lorsque l'acidité dépasse 3,5 à 4 g d'acide lactique par litre. Dans ces conditions, il devient difficile d'interpréter l'inhibition, partielle ou totale, constatée sur les crèmes pasteurisées en voie d'acidification. Les observations faites n'en permettent pas moins de conclure que les possibilités d'une réactivation notable dans les crèmes ensemencées et mûries en vue de la fabrication du beurre doivent être très faibles, compte tenu de l'acidité développée, du temps et de la température de maturation. Cependant, elles ne sont sans doute pas nulles puisque des réactions positives ont été signalées sur des beurres provenant de crèmes mûries et correctement pasteurisées. Aussi, conviendrait-il de pouvoir différencier l'enzyme résiduelle de l'enzyme « réactivée » afin d'être en mesure d'utiliser valablement l'épreuve de la phosphatase alcaline dans le contrôle des beurres pasteurisés.

Les travaux réalisés à ce jour laissent penser que ces enzymes ne possèdent pas des propriétés différentes : même pH optimum, même évolution d'activité en fonction du pH (Wright et Tramer, 1953 *a*). Si certains auteurs ont noté une plus grande thermorésistance de la phosphatase « réactivée » (Haller, Babcok et Ellis, 1941 ; Barber et Frazier, 1943) d'autres observent au contraire que cette dernière est plus sensible à l'action thermique (Fuchs, 1953 ; Siegenthaler, 1954) ou qu'il n'y a pas de différence dans la thermorésistance de l'une et de l'autre de ces enzymes (Usseglio-Tomasset, 1961). Il semble bien que l'on puisse dire avec Wright et Tramer (1953 *a*) que la phosphatase « réactivée » est apparemment identique à la phosphatase naturelle. La différenciation entre les deux enzymes ne peut alors reposer sur la nature de la phosphatase « réactivée ».

Peut-être pourrait-elle être fondée sur le mécanisme de la réactivation ? Ce dernier est, nous l'avons vu, controversé, mais des observations récentes (Wright et Tramer, 1953 *b* ; Rapport Reading, 1959 ; Hansson, 1961), suggèrent que la modification de la structure moléculaire de l'enzyme, par chauffage, est réversible et que sous l'influence de substances réductrices, notamment les groupements sulfhydriles, le complexe enzymatique pourrait être reconstitué et par suite réactivé.

Ainsi Hansson (1961) constate que, sur un lait pasteurisé 20 secondes à 73°C puis conservé 24 et 48 heures à 20°C, l'addition de chlorhydrate de cystéine s'accompagne d'une réactivation sensible de la phosphatase alcaline. Sur le lait témoin, non additionné d'acide aminé porteur du groupement SH, aucune réactivation ne se manifeste.

D'autre part, Mc Farren et *al.* (1960), au cours de leurs études sur les facteurs de la réactivation, observent, dans les produits pasteurisés HTST la présence de phosphatase inactive, mais réactivable. Ils constatent que cette phosphatase peut être « réactivée » par incubation courte à température relativement élevée en présence

de l'ion magnésium, dont on sait qu'il fait partie de la molécule de l'enzyme. Se fondant sur cette observation, ces auteurs appliquent un test de différenciation de la phosphatase « réactivée » et de la phosphatase résiduelle du lait et de la crème pasteurisée HTST. En présence d'ion magnésium, ils notent une augmentation sélective de l'activité de la phosphatase « réactivée ».

Partant de ces données, nous nous attachons à vérifier les différences de comportement, vis-à-vis de certains agents activateurs, de la phosphatase « réactivée » et de la phosphatase originelle.

Reçu pour publication en mai 1964.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF REACTIVATION CONDITIONS OF ALKALINE PHOSPHATASE IN CREAMS PASTEURIZED

In samples of cream pasteurized at high temperature (80 to 95°C) for short times (15 to 30 sec.), reactivation of alkaline phosphatase occurs markedly. The conditions of this reactivation were studied and discussed. Three factors are of particular importance : temperature of heating, storage conditions and acidity of cream.

Thus, appreciable differences in the intensities of reactivation have been found when pasteurization was conducted at 80°C for 30 sec. or at 90°C for 20 sec. although the inhibitory effect exerted by these two « time × temperature » combinations on cream alkaline phosphatase were almost equivalent.

The intensity of the phenomenon is equally influenced by the temperature and the duration of storage. The maximum intensity is at a temperature around 30°C. At this temperature, reactivation is already very marked after a storage time of 12 h. At lower temperature (4° or even 11°C), the phenomenon only occurred to a small extent.

Finally, cream acidity has a marked inhibitory effect. When it reaches 4 to 4,5 g lactic acid per litre, intensity of reactivation is very low or nil.

These observations have pratical and important bearings as far as conditions of industrial treatment of pasteurized cream are concerned.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASCHAFFENBURG R., MULLEN J. E. C., 1949. A rapid and simple phosphatase test for milk. *J. Dairy Res.*, **16**, 58-67.

BARBER F. W., 1942. Factors affecting the phosphatase test. *Amer. Butter Rev.*, **4**, 206-210.

BARBER F. W., FRAZIER W. C., 1943. Development of a positive phosphatase test in refrigerated pasteurized cream. *J. Dairy Sci.*, **26**, 343-352.

BASILLE D., 1962. Méthodes pour apprécier le traitement thermique et pour estimer, après ce traitement, la qualité : *a*) du lait et des produits laitiers ; *b*) des œufs et des ovoproduits. *C. R. 3e Symposium W.A.V.F.H Nice*, 288-302.

BERGMAN T., 1941. Utilisation pratique de l'épreuve de la phosphatase pour le sérum (en suédois). Svenska Mejeritidn., **33**, 389-394.

BROWN W. H., 1940. Some of the factors affecting the phosphatase values of butter. *J. Dairy Sci.*, **23**, 510-511.

BROWN W. H., ELLICKER P. R., 1942. The effect of flash pasteurization and subsequent treatment on the phosphatase value of cream. *J. Bact.*, **43**, 118-119.

BUCK T. C. Jr., 1942. False positive phosphatase test from a thermophil in pasteurized milk. *Amer. J. Publ. Hlth.*, **32**, 1224-1236.

EDDLEMAN T. L., BABEL F. J., 1958. Phosphatase reactivation in dairy products. *J. Milk Fd. Tech.*, **21**, 126-130.

FRAM H., 1957. The reactivation of phosphatase in HTST pasteurized dairy products. J. *Dairy Sci.*, **49**, 19-27.

FUSCHS. A., 1953. Biologische und physiologische Merkmale der uperisierten Milch. *C. R. XIIIe Congr. Int. Lait., La Haye*, **3**, 1018-1020.

HALLER, BABCOCK, ELLIS, 1941. *Technic. Bull. U. S. Départ. Agric.*, n° 800.

HANSSON E., 1961. Réactivation de la phosphatase alcaline du lait (en suédois). *Svenska Mejeritidn.*, **53**, 183-192.

LYSTER R. L. J., ASCHAFFENBURG R., 1962. The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment *J. Dairy Res.* **29**, 21-35.

MCFARREN E. F., THOMAS R. C., BLACK L. A., CAMPBELL J. E., 1960. Differenciation of reactivated from residual phosphatase in HTST, pasteurized milk and cream. *J. Ass. Off. Agric.Chem.*, **43**, 414-426.

MICKLE J. B., DIAB R., OLSON H. C., 1960. Phosphatase reactivation in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, **43**, 437.

NATIONAL INSTITUTE FOR RESEARCH IN DAIRYING, 1959 report. University of Reading, Shinfield, Berk shire, 78.

PASCHKE B., 1958 *a*. Regeneration der Phosphatase. *Milchwissenschaft*, **13**, 73-75.

PASCHKE B., 1958 *b*. Regeneration der Phosphatase. *Milchwissenschaft*, **13**, 553-554.

POSTHUMUS G., 1952. Réactivation positive de la phosphatase dans la crème pasteurisée et le beurre (en hollandais). *Off. Org. K. ned. Zuivelb.*, **44**, 458.

RITTER W., 1953. Das Verhalten der Phosphatase bei der Pasteurisation des Rahmes. *C. R. XIIIe Cong. Int. Lait., La Haye*, **3**, 1014-1017.

SANDERS S. P., 1949. The phosphatase test for pasteurization of dairy products. *C. R. XIIe Cong. Int Lait., Stockholm*, **2**, 757-765.

SANDERS S. P., SAGER O. S., 1949. Preservation of dairy products for the phosphatase test. *J. Dairy Sci.*, **32**, 166-174.

SCHOLZ E. M., 1956. Untersuchung über die Phosphatasereaktion in Kurzzrit erhitzter Milch und Rahm. *Kieler Milchwirtschaft Forschberichte*, **8**, 233-262.

SIEGENTHALER E., 1954. Reaktivierte Phosphatase in hoch Pasteurisiertem Schalagrahm und deren Nachweis. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **4**, 84-92.

SIMONART P., HUBERLANT J., 1956. Contribution à l'étude de l'inversion de l'épreuve de la phosphatase. *C. R. XIVe Cong. Int. Lait., Rome*, **1**, 251-257.

SJÖSTRÖM G., 1943. *Svenska Mejeritidn.*, **35**, 269.

SJÖSTRÖM G., 1944. *Svenska Mejeritidn.*, **36**, 119.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1961. La riattivazione della fosfatasi alcalina nelle creme. *Latte*, **35**, 804-806.

WILEY W. J., NEWMAN F. S. J., WHITEHEAD H. R., 1941. A study of some factors influencing the phosphatase reaction of flash pasteurized cream and butter made from it. *J. Counc. Sci. Industr. Res.*, **14**, 121.

WRIGHT R. C., 1956. The influence of reactivation of phosphatase upon the assessment of the heat treatment of milk and cream. *C. R. XIVe Cong. Int. Lait., Rome*, **3**, 717-731.

WRIGHT R. C., TRAMER J., 1953 *a*. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. *J. Dairy Res.*, **20**, 177-188.

WRIGHT R. C., TRAMER J., 1953 *b*. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. *J. Dairy Res.*, **20**, 258-273.

WRIGHT R. C., TRAMER J., 1954. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. *J. Dairy Res.*, **21**, 37-49.

WRIGHT R. C., TRAMER J., 1956. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment : IV. The influence of certain metallic ions. *J. Dairy Res.*, **23**, 248-256.

Ann. Technol. agric., 1964, **13** (4), 399-448.

ACTION DES RADIATIONS IONISANTES SUR L'AMIDON. EFFETS DES RADIATIONS GAMMA, A LA DOSE DE 30 MR, SUR L'AMIDON DE POMME DE TERRE EN FONCTION DE SA TENEUR EN EAU (1)

H. REUSCHL et A. GUILBOT

Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Céréales de l'Institut national de la Recherche agronomique, au C.E.R.D.I.A Massy (Seine-et-Oise)

PLAN

(1) Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat ès Sciences naturelles soutenue par H. REUSCHL le 15 novembre 1962 à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

INTRODUCTION

Ces dernières années, à la suite de la réalisation de puissants générateurs de radiations ionisantes, les recherches concernant l'action de telles radiations sur la matière se sont particulièrement développées.

L'investigation des processus de transformations physiques et chimiques du matériel irradié, transformations prenant naissance dans l'activation de la couche électronique des molécules et conduisant à des ruptures de liaisons, à des réarrangements intramoléculaires, à des transferts intermoléculaires de l'énergie d'activation, permettra de contribuer à la connaissance de la structure fine des molécules ainsi que de la structure supramoléculaire du matériel irradié. La chimie des radiations constitue ainsi un chapitre important de la chimie théorique.

L'utilisation de l'énergie rayonnante en technologie chimique s'est montrée intéressante dans divers domaines. Contrairement à la plupart des réactions chimiques habituelles procédant par chocs thermiques entre les molécules du milieu réactionnel, qui doit par conséquent être plus ou moins fluide, le « bombardement » de la matière par les particules des radiations ionisantes permet :

— de provoquer des réactions à l'état solide ;

— de localiser les effets, dans un mélange de substances solides, en fonction de la sensibilité des constituants.

En outre, le haut degré d'activation atteint par les molécules offre les possibilités :

— de synthétiser des corps nouveaux, inaccessibles par d'autres voies ;

— de remplacer des synthèses « classiques » procédant par étapes, par la synthèse « directe ».

Dans le domaine des synthèses organiques, l'utilisation des radiations ionisantes se trouve limitée du fait que l'irradiation de la plupart des composés fournit un mélange très complexe de produits. Cependant, dans certains cas, les mécanismes de réactions sont tels, ou peuvent être dirigés par un choix convenable de conditions opératoires de telle façon, que la formation d'un seul produit soit favorisée. Parmi les synthèses radiochimiques exploitées industriellement, surtout aux États-Unis, citons les synthèses :

— du phénol, à partir du benzène, de l'eau et de l'oxygène ;
— du lindane, à partir du benzène et du chlore ;
— de l'éthylèneglycol, à partir du méthanol ;
— de l'aniline, à partir du benzène et de l'ammoniac.

L'induction de la polymérisation par l'irradiation de certains composés, en particulier les composés vinyliques, $CH_2 = CHR$, (R = H, Cl, CN) est exploitée

dans la fabrication de nombreux polymères. La polymérisation est induite par un petit nombre de radicaux ou de molécules ionisées dont les réactions avec des molécules neutres se propagent en chaîne ; le rendement énergétique des polymérisations radiochimiques est ainsi très élevé.

L'irradiation des polymères permet, à l'état solide, de modifier profondément leurs propriétés physiques, en produisant suivant la structure du monomère, soit une dégradation, soit une réticulation des chaînes macromoléculaires. Comme exemples d'application industrielle, citons :

— la réticulation du polyéthylène commercial, produit semi-cristallin dont le point de ramollissement se situe entre 70 et 115°C, qui fournit un produit transparent ne fondant qu'à une température supérieure à 300°C ;

— la réticulation du caoutchouc naturel, qui, pour la fabrication de certaines qualités de caoutchouc, remplace la vulcanisation par le soufre ;

— la dégradation du dextrane, qui permet d'obtenir des produits de remplacement du plasma sanguin, le procédé radiochimique se substituant à l'hydrolyse acide.

Enfin, de nombreux laboratoires étudient actuellement les possibilités d'utiliser les radiations ionisantes dans la stérilisation des aliments.

L'action des radiations ionisantes sur l'amidon, objet de notre travail, a déjà fait l'objet d'investigations par plusieurs auteurs. D'un point de vue pratique, ces travaux permettront de connaître les altérations qui risquent de se produire au cours de l'irradiation des aliments amylacés, tout en indiquant les possibilités de modifier les propriétés physiques et chimiques d'une matière première industrielle importante.

Sur le plan théorique, il nous semble, en particulier, intéressant de connaître l'influence de la structure supramoléculaire de l'amidon à l'égard des réactions radiochimiques des chaînes polyosidiques, problème qui n'a pas été abordé dans les travaux effectués jusqu'à présent. Comme l'ont montré plusieurs méthodes d'investigation, dont nous rappellerons les résultats, les caractéristiques de cette structure physicochimique de l'amidon sont fonction de sa teneur en eau.

C'est pourquoi, tout en essayant de compléter et de préciser les résultats des travaux antérieurs sur l'action des radiations ionisantes sur l'amidon, nous nous sommes proposés d'étudier les effets induits en fonction de la teneur en eau.

I. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Dans un premier chapitre, nous exposerons les principales caractéristiques de la structure physicochimique et chimique du grain d'amidon en insistant en particulier sur les différents modes de fixation de l'eau mis en évidence par plusieurs méthodes d'investigation.

Dans le second chapitre, nous indiquerons les principes essentiels de la théorie de la chimie des radiations tout en mettant l'accent sur les aspects particuliers de l'irradiation des polymères.

Dans le troisième chapitre, nous examinerons les travaux déjà effectués sur l'irradiation de l'amidon.

1. — Les principales caractéristiques de l'amidon (Greenwood, 1956 ; Badenhuizen, 1958 ; Whelan, 1958)

De nombreuses mises au point ont été publiées sur l'aspect physicochimique et chimique de le structure de l'amidon ; nous nous bornerons à en rappeler les principales caractéristiques dans la mesure où cela nous paraîtra nécessaire pour l'interprétation des résultats de notre travail.

11. — *Structure physicochimique du grain d'amidon*

Produit secondaire de la photosynthèse, l'amidon constitue la substance de réserve la plus importante de la plante ; on le trouve principalement dans les grains, les tubercules ou les racines sous forme d'éléments figurés : les grains d'amidon.

A l'examen microscopique, le grain d'amidon apparaît généralement comme formé de couches distribuées autour du « hile » qui, en lumière polarisée, constitue le point d'intersection d'une croix noire sur le fond clair du grain. A la suite d'études récentes au microscope électronique, Guilbot et Levavasseur (1959) ont conclu que le grain d'amidon était très probablement constitué d'enveloppes superposées entre lesquelles se trouverait un réseau d'alvéoles contenant des granules, certains éléments constitutifs présentant une structure spiralée.

Les diagrammes de diffraction des rayons X sont, pour des amidons de même teneur en eau, caractéristiques de leur origine botanique et, récemment, Legrand et Yovanovitch (1957) ont précisé que ces diagrammes pouvaient être classés en deux groupes essentiels seulement : spectre A, type amidon de céréales ; spectre B, type amidon de tubercules. Cependant, en fonction de la teneur en eau de l'amidon, ces spectres subissent une évolution constante : apparition de nouvelles raies, augmentation de l'intensité de raies déjà présentes. L'eau apparaît ainsi comme un constituant principal de la structure physicochimique du grain d'amidon : séché, il présente un spectre correspondant à un état pratiquement amorphe ; pour obtenir le développement plus ou moins complet d'une structure organisée, une teneur en eau d'environ 14 p. 100 pour les amidons de céréales et 19 p. 100 pour la fécule de pomme de terre est nécessaire. A cette humidité optimum, le grain d'amidon est considéré comme constitué de régions amorphes et de régions organisées, appelées « cristal-

lites » ; ceux-ci résulteraient de l'apposition de segments des macromolécules constituant l'amidon, l'attraction étant assurée principalement par des liaisons « hydrogène » entre les groupements OH des macromolécules avec participation ou non de molécules d'eau. D'après des travaux récents (ZOBEL et SENTI, 1960), les zones cristallines représenteraient 25 p. 100 de l'ensemble du grain dans le cas de l'amidon de pomme de terre et 30 à 40 p. 100 dans le cas de l'amidon des céréales.

12. — *Les différents modes de fixation de l'eau par le grain d'amidon*

Dans une atmosphère saturée d'eau à température ordinaire, l'amidon de pomme de terre fixe environ 33 p. 100 d'eau(1). Cette grande affinité de l'amidon pour l'eau résulte des forces d'attraction de caractère dipolaire entre les nombreux groupements OH présents sur les chaînes polyosidiques et les molécules d'eau. Le fait que de telles quantités d'eau ne se congèlent qu'à des températures en dessous de — 180°C montre l'importance des forces de fixation, forces qui sont par conséquent nettement supérieures à celles qu'exercent les molécules d'eau entre elles pour former de la glace.

Des méthodes d'investigation appropriées ont permis d'approfondir nos connaissances sur l'état de fixation de l'eau dans le grain d'amidon.

Méthode de sorption (GUILBOT et DRAPRON, 1950-57).

Expérimentalement, la méthode consiste à déterminer à une température donnée la quantité d'eau fixée par l'amidon, en fonction de la tension de vapeur d'eau relative de l'atmosphère environnante ; cette tension représentant, par définition, l'activité de l'eau dans le système.

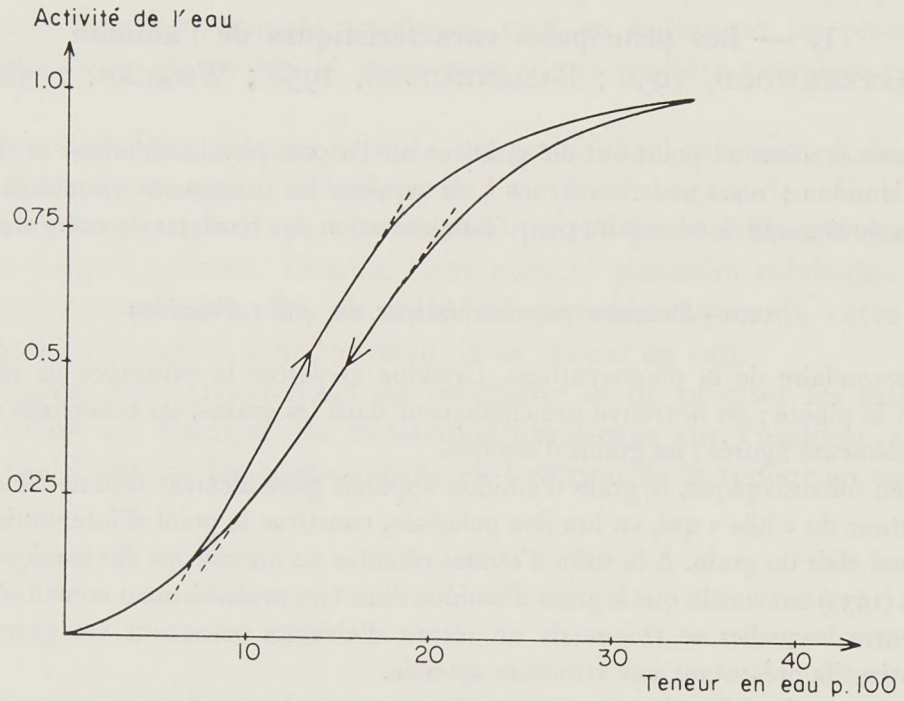


FIG. 1. — *Isotherme à 20°C de l'activité de l'eau, dans le système amidon-eau, en fonction de la teneur en eau*

L'activité de l'eau dans l'amidon, graphiquement reliée à sa teneur en eau, évolue suivant une courbe en S ; mesurée par hydratation (adsorption) ou par déshydratation (désorption), l'activité est différente pour une même teneur en eau : on obtient ainsi deux courbes, la courbe d'adsorption et celle de désorption qui se joignent à l'origine (tension de vapeur d'eau relative 0 p. 100) et à l'activité = 1 (tension de vapeur d'eau relative 100 p. 100), témoignant d'un phénomène d'hystérésis (fig. 1).

Ces courbes sont interprétées comme décrivant plusieurs phénomènes qui se succèdent en se

(1) Les pourcentages d'eau indiqués sont rapportés à la substance humide.

superposant. Dans la première partie de la courbe, l'activité de l'eau ne se développe que tardivement : l'adsorption s'effectue sur les points actifs, les forces de fixation de l'eau à l'amidon sont importantes. A partir d'une certaine teneur en eau, l'activité croît linéairement avec celle-ci. Dans cette partie de la courbe, la fixation de l'eau obéit à la loi de HENRY ; l'amidon « dissout » l'eau en formant une solution solide.

Dans le troisième domaine d'hydratation, l'activité s'accroît de nouveau lentement et tend asymptotiquement vers 1 : une nouvelle « phase aqueuse » apparaît, l'eau est fixée par des forces plus faibles, soit de nature capillaire, soit de nature osmotique. La teneur en eau, correspondant à l'activité 1 de l'eau « libre », est voisine de 33 p. 100.

Les teneurs en eau qui délimitent la croissance linéaire de l'activité semblent marquer l'apparition d'états particuliers de fixation de l'eau. Pour l'amidon de pomme de terre, les teneurs en eau correspondantes sont, en adsorption d'environ 8 et 14 p. 100, en désorption d'environ 9,5 et 16,5 p. 100.

Méthode aux rayons X.

Une étude systématique de l'évolution des spectres de diffraction des rayons X par l'amidon en fonction de sa teneur en eau a dernièrement été effectuée par GUILBOT et *coll.* (1961). Ce travail fait ressortir que certaines teneurs en eau marquent des étapes dans le processus de l'organisation de la structure de l'amidon. Les résultats obtenus pour l'amidon de pomme de terre, hydraté en sorption, sont les suivants :

— dans les amidons peu hydratés, deux raies principales à 11°25′ et 11°56′ apparaissent, s'intensifient pour atteindre un maximum à une teneur en eau voisine de 8 p. 100 ;

— pour une teneur en eau d'environ 14 p. 100, une nouvelle raie apparaît à 2°45′, elle correspond à une équidistance de 16,1 Å et serait, selon plusieurs auteurs, attribuable à une des dimensions d'une maille quadratique ;

— pour des hydratations plus importantes, on constate un affinement progressif des raies présentes.

Ces teneurs en eau remarquables d'environ 8 et 14 p. 100 sont en bon accord avec les points d'hydratation singuliers mis en évidence sur la courbe de sorption. Pour des amidons en désorption, il est vraisemblable que ces chiffres auraient été un peu plus élevés.

Déshydratation par chauffage aux infrarouges.

Élaborée par ULMANN (1959), la méthode met à profit la différence de vitesse d'évaporation de l'eau en fonction de son état de fixation au substrat.

Le produit à déshydrater est soumis, dans des conditions définies, à un rayonnement assurant un chauffage uniforme. La vitesse de séchage est portée en fonction de la teneur en eau correspondante du produit.

L'allure de la courbe de déshydratation de l'amidon de pomme de terre ainsi obtenue permet de constater :

a) une diminution progressive de la vitesse de déshydratation : la fixation de l'eau devient de plus en plus forte au fur et à mesure que l'amidon se déshydrate ;

b) deux discontinuités correspondant à des teneurs en eau de 33 ± 1 p. 100 et 10,5 ± 0,5 p. 100, cette deuxième discontinuité étant beaucoup plus marquée que la première.

Ces résultats indiquent que les forces d'attraction fixant les premiers 10 p. 100 d'eau de l'amidon sont plus importantes que celles intervenant au cours d'une hydratation ultérieure. Ils permettent également de différencier le point d'hydratation de 33 p. 100, à partir duquel l'amidon de pomme de terre ne fixe plus d'eau en phase vapeur, et qui peut être considéré comme le point de transition entre l'eau de sorption et l'eau « libre ».

Hydratation en solution saline. (CHAMPETIER et YOVANOVITCH, 1952 ; YOVANOVITCH, 1955).

La méthode des « restes » de SHRINEMAKERS a été appliquée par CHAMPETIER et *coll.* à l'étude des phénomènes d'adsorption dans les systèmes ternaires constitués de polyholosides (cellulose ou amidons) de divers sels et d'eau.

Elle est basée sur l'analyse du polymère, plus ou moins essoré, après avoir été en contact avec des solutions salines aqueuses de diverses concentrations. Pour une concentration de sel donnée, la courbe représentant les teneurs en sel, en fonction des teneurs en eau, d'une série de prises d'essais essorées de façon à avoir des quantités variables de liquide restant, est une droite ; en faisant varier la concentration, on obtient un faisceau de droites. La convergence de ces droites en un point indique une certaine relation entre la fixation de l'eau et du sel par la macromolécule.

L'analyse, par la méthode des restes, de l'amidon de maïs et de pomme de terre mis en contact avec des solutions de thiosulfate de sodium de concentrations variables, a permis de mettre en évidence un « monohydrate « $(C_6H_{10}O_5, H_2O)n$ pour l'amidon de maïs ; un « mono- » et un « dihydrate » pour l'amidon de pomme de terre ; les teneurs en eau de ces hydrates exprimées en p. 100 de substance humide sont respectivement 10 et 18,2 p. 100. L'existence du « monohydrate » de l'amidon de maïs a été observée pour des concentrations en sel entre 6 et 280 g de thiosulfate de sodium par litre. Le « dihydrate » de l'amidon de pomme de terre est stable pour des concentrations en sel entre 6 et 100 g/l : à partir de cette concentration, il se décompose assez brusquement pour donner place au « monohydrate » dont la stabilité a été observée jusqu'à une concentration de 400 g de $Na_2S_2O_3$/l.

Conclusions.

Les résultats des méthodes d'investigation citées, qui pourraient être complétés par ceux fournis par la détermination de la chaleur d'hydratation et par les mesures diélectriques, qui permettent d'apprécier l'énergie d'activation des groupements OH en fonction de l'hydratation (GUILBOT, résultats inédits ; GUILBOT et *coll.*, 1960), suffisent pour conclure que, dans l'amidon, l'eau est soumise à plusieurs types de forces d'attraction.

Bien que ces méthodes mettent en œuvre des principes très différents, elles s'accordent généralement pour mettre en évidence certaines étapes dans le processus d'hydratation.

Pour l'amidon de pomme de terre, ces teneurs en eau singulières sont de :

a) 8-10 p. 100 correspondant :

à la fin de l'adsorption ou de la désorption rapide ;
à la fin de l'élaboration d'une certaine organisation de structure ;
à une diminution brusque de la vitesse de déshydratation ;
à la formation d'un « monohydrate ».

b) 16,5 à 18,2 p. 100 correspondant :

au début de la sorption linéaire ;
à la formation d'un « dihydrate » ;

c) 33 p. 100 correspondant :

à la limite supérieure de sorption d'eau en phase vapeur ;
à une diminution brusque de la vitesse de déshydratation ;
à l'apparition de l'eau facilement congelable au voisinage de 0°C.

13. — *Constitution chimique de l'amidon*

Les indications sur la structure chimique et les caractéristiques physicochimiques des macromolécules de l'amidon sont obtenues à partir de l'étude de leurs solutions. Or, en raison de sa structure organisée, le grain d'amidon exige, pour la solubilisation de ses constituants, des traitements tels que le chauffage dans l'eau à 120°C pendant une demi-heure, ou la dispersion dans la soude 1 N, qui risquent de modifier leur structure chimique.

Dans une dispersion aqueuse d'amidon, deux composants peuvent être séparés grâce à leur comportement différent vis-à-vis du butanol : l'un, l'amylose, formant un complexe insoluble, l'autre, l'amylopectine, restant en solution. Ces deux fractions sont également mises en évidence par analyse chromatographique d'une solution d'amidon sur une colonne d'alumine : après révélation de la

colonne à l'aide d'une solution d'iode, deux zones, l'une colorée en bleu, l'autre en violacé, apparaissent, nettement séparées par une zone non colorée.

Tous deux polymères du glucose, les composants de l'amidon se distinguent par leur constitution macromoléculaire ; les macromolécules de l'amylose constituent des chaînes droites déterminées par des liaisons glucosidiques alpha-1,4 entre les unités glucose, tandis que les macromolécules de l'amylopectine sont ramifiées, des chaînes de glucoses reliés en alpha-1,4 se greffant les unes aux autres par des liaisons glucosidiques alpha-1,6.

Le degré de ramification de l'amylopectine, défini par le nombre de liaisons-1,6 pour 100 unités glucose a été déterminé par des analyses structurales basées sur la méthylation et l'oxydation periodique ; les valeurs, pour l'amylopectine de l'amidon de pomme de terre, sont les suivantes : 4,1 p. 100 par méthylation, 3,8 p. 100 par oxydation periodique.

Les macromolécules de l'amylose en solution sont considérées comme enroulées suivant une spirale à l'intérieur de laquelle certains agents, tels que le butanol et l'iode, peuvent s'insérer, pour former des complexes insolubles, l'amylopectine ne présentant pas cette propriété.

La quantité d'iode fixée par l'amylose peut être déterminée par potentiométrie. Dans les conditions de ce dosage, l'amylose absorbe de 18 à 20 p. 100 d'iode suivant son origine. Comme l'absorption par l'amylopectine est négligeable, le dosage de la quantité d'iode absorbée par un amidon permet de déterminer sa teneur en amylose. Les différents amidons contiennent des quantités d'amylose allant de 0, pour l'amidon de maïs cireux, à 77 p. 100, pour l'amidon de pois ridé ; l'amidon de pomme de terre a une teneur en amylose de 20 à 22 p. 100.

Le degré de polymérisation (DP) des deux constituants de l'amidon, notamment celui de l'amylopectine, est encore matière à discussion.

Pour les constituants de l'amidon de pomme de terre, les valeurs suivantes ont été obtenues par plusieurs auteurs à l'aide de différentes méthodes physiques :

	Dérivé	Méthode (1)	DP
Amylose	non substitué	O	1 000
	triacétate	O	3 800
	—	S et D	240
Amylopectine	non substitué	S et D	6 000
	—	L	220 000
	triacétate	L	230 000
	—	O	2 000

(1) O = Osmométrie.
S et D = Sédimentation et diffusion.
L = Diffusion de la lumière.

Les écarts entre ces valeurs sont dus, d'une part à la préparation même des fractions donnant lieu à des dégradations plus ou moins importantes suivant la technique utilisée, d'autre part aux erreurs systématiques de la méthode de mesure.

Il a été démontré que la dissolution du grain d'amidon dans l'eau bouillante en présence d'oxygène et dans la soude provoque une diminution du poids moléculaire de ses constituants. L'acétylation du grain d'amidon en milieu pyridine suivie d'un fractionnement des constituants acétylés par différence de solubilité dans le chloroforme, est considérée comme constituant la méthode de préparation la plus douce. Les solutions des produits acétylés dans des solvants organiques évitant dans une large mesure des interactions électrostatiques entre solutions et solutés, se prêtent mieux à la mesure du DP que les solutions aqueuses des constituants non substitués.

Tandis que pour l'amylose, les valeurs de DP obtenues sont au moins du même ordre de grandeur, celles de l'amylopectine varient dans des proportions de 1 à 40 ou 100 environ. Certains auteurs attribuant les DP élevés mesurés par diffusion de la lumière à la présence d'agrégats de macromolécules (molates), l'ordre de grandeur du DP de l'amylopectine reste jusqu'à présent incertain.

2. — Notions fondamentales concernant le mode d'action des radiations ionisantes sur la matière

L'étude de l'action des radiations ionisantes n'a pas encore abouti, jusqu'à présent, à une théorie cohérente reliant les effets observés à la structure des substances irradiées. Dans le but d'exposer les notions fondamentales et les résultats d'ordre général de ce domaine de recherches, nous avons consulté les ouvrages des auteurs suivants : HAISSINSKY (1957) ; LEFORT (1959) ; CHARLESBY (1960) ; DEROSIER et ROSENSTOCK (1960).

21. — *Généralités, définitions*

Le terme « radiation ionisante » désigne un rayonnement de particules à haute énergie capable de provoquer l'ionisation d'atomes ou de molécules en traversant la matière.

Des radiations ionisantes sont formées, soit par des éléments radioactifs, émettant des particules — électrons, protons, neutrons et photons — soit par des générateurs à haute puissance électrique. Un rayonnement à particules données est caractérisé par l'énergie cinétique de celles-ci mesurée en MeV (méga-électron-volt) et par la proportion d'entre elles qui traverse l'unité de surface dans l'unité de temps ; dans le cas des éléments radioactifs, cette quantité de particules est liée à leur activité mesurée en Curies, représentant le nombre de désintégrations par seconde.

L'énergie des radiations ionisantes cédée au système irradié, qui se manifeste par des changements physiques et chimiques, constitue la « dose » d'énergie.

Le « rœntgen » (r) représente la première unité de dose ; elle est définie pour les radiations gamma et X. Sa définition est basée sur la mesure, dans la chambre à gaz, du nombre d'ions formés lors de l'irradiation de l'air.

Définition : L'irradiation d'un g d'air sec par 1 r de radiations gamma ou X produit $1{,}6 \cdot 10^{12}$ ions des deux signes. En admettant que l'énergie nécessaire pour la formation d'une paire d'ions dans l'air est de l'ordre de 34,5 *e*V, la formation de $1{,}6 \cdot 10^{12}$ paires d'ions est équivalente à l'absorption de $5{,}45 \cdot 10^{13}$ *e*V. Un *e*V étant égal à $1{,}6 \cdot 10^{-12}$ erg, l'énergie absorbée par 1 g d'air, par irradiation à une dose d'un rœntgen est d'environ 87 ergs.

La définition du rœntgen se rapporte à un flux déterminé de rayonnement X ou gamma. Elle ne tient pas compte de l'énergie effectivement absorbée dans le système irradié qui, pour la même intensité du flux de rayonnement, varie avec la nature du rayonnement et les caractéristiques du système irradié. C'est ainsi que l'irradiation gamma de 1 g d'eau à une dose d'un r correspond à une absorption d'énergie de 97,4 ergs au lieu de 87 ergs dans le cas de l'air.

Pour éviter ces difficultés et rendre l'unité de dose indépendante de la nature du rayonnement et du système à irradier, on a défini une nouvelle unité, le rad, qui se rapporte à la quantité d'énergie absorbée :

1 rad est équivalent à l'absorption de 100 ergs par g de matière irradiée. Dans le cas de radiations gamma et X, les unités r et rad sont équivalentes, à un facteur près, variable avec la substance irradiée : ainsi pour l'air, 1 rad équivaut à $\frac{100}{87}$ r et pour l'eau, à $\frac{100}{97{,}4}$ r.

Pour la plupart des produits chimiques, l'énergie effectivement absorbée ne peut être déterminée de façon précise, en raison de la complexité des processus dans lesquels cette énergie est consommée. Il est cependant généralement admis que, dans des limites assez étroites, les substances organiques, pour des conditions d'irradiation égales, absorbent la même quantité d'énergie que l'eau.

L'évaluation de l'énergie absorbée est possible pour des substances dans lesquelles les radiations

produisent un effet physique ou chimique déterminé. Ces substances peuvent être utilisées en pratique pour la mesure de la « dose » de radiation ; c'est le cas de la dosimétrie au sulfate ferreux par exemple.

22. — *Formation des molécules activées*

Étant donné la place très réduite du noyau et des électrons par rapport à l'espace vide, la probabilité pour que les particules « ionisantes » entrent en collision avec ceux-ci ne devient importante que pour des faisceaux extrêmement intenses, ou pour des irradiations de très longue durée dans le cas d'un rayonnement moins intense. La collision d'une particule « ionisante », animée d'une vitesse suffisante, avec un noyau, induit la désintégration radioactive de celui-ci, phénomène qu'on cherche à éviter en chimie des radiations. L'interaction des particules ionisantes chargées avec le champ électrique du noyau, telle qu'on l'observe pour des faisceaux d'électrons intenses, ne concerne principalement que le changement des caractéristiques du faisceau, l'énergie consommée étant réémise sous forme d'un rayonnement électromagnétique sans induire des modifications chimiques.

L'interaction de particules ionisantes chargées avec le champ électrique de la couche électronique d'une molécule rencontrée constitue le mode d'action de loin le plus probable, étant donné l'importance que représente cette couche dans l'espace moléculaire. C'est principalement ce mode d'interaction qui est à l'origine des modifications chimiques induites par les radiations ionisantes.

Tandis que les radiations à particules chargées — les radiations alpha et bêta — agissent par voie directe, l'action des radiations à particules neutres — gamma et neutrons — s'effectuent essentiellement par l'intermédiaire des particules chargées qu'elles ont initialement libérées par des chocs sur les électrons ou le noyau des molécules irradiées. Les photons des radiations gamma, dont la « masse » est comparable à celle de l'électron, libèrent des électrons tandis que les neutrons agissent sur les noyaux d'où ils éjectent des particules chargées telles que protons et particules alpha. Les particules chargées ainsi libérées sont animées d'une grande énergie cinétique, comparable à celle de la particule neutre primaire. Par interaction avec le champ de la couche électronique des molécules rencontrées, elles donnent naissance à un nombre élevé d'autres particules chargées devant lequel le nombre de chocs primaires est négligeable.

Lors du passage d'une particule chargée dans le champ électrique de la couche électronique d'une molécule, une interaction mutuelle a lieu qui conduit, d'une part à l'augmentation de l'énergie potentielle des électrons, c'est-à-dire à l'activation de la molécule, d'autre part, à une perte d'énergie cinétique de la particule agissante, qui se trouve ralentie et déviée dans son parcours.

L'état d'activation atteint par la molécule dépendra, pour une particule incidente donnée, de son énergie cinétique et de la profondeur à laquelle elle pénètre dans la couche électronique. Le long du parcours du rayon incident, il se formera ainsi soit des molécules ionisées, un électron ayant été libéré, qui peut à son tour « activer « d'autres molécules, soit des molécules excitées, lorsque l'énergie acquise par la molécule est plus petite que l'énergie minimum de liaison d'un électron.

La formation d'une paire d'ions par irradiation exige en moyenne une énergie d'environ 34 *e*V ; la valeur trouvée à l'aide de calculs théoriques et des mesures varie peu avec la nature de la substance irradiée. Comme l'énergie nécessaire pour ioniser une molécule ou un atome est de l'ordre de 10-15 *e*V, la différence, 20-24 *e*V est consommée dans l'excitation des molécules.

Les molécules activées ont une durée de vie extrêmement courte ; leur désactivation donne naissance aux modifications chimiques du milieu irradié.

23. — *Réactions chimiques induites*

Mécanismes généraux de réactions.

L'irradiation d'un composé induit, en général, plusieurs réactions consécutives ou simultanées qui se produisent avec une grande rapidité et qui conduisent à la formation d'une grande variété de produits. L'interprétation rigoureuse et complète du mode de formation des composés obtenus est ainsi rendue très difficile.

L'énergie acquise par une molécule lors de son interaction avec une particule chargée, ionisante, augmente l'énergie de vibration des liaisons et conduit finalement à la rupture de certaines d'entre elles.

Pour une molécule affectée d'une énergie d'excitation nettement supérieure à celle nécessaire à la rupture de la liaison la plus forte, la décomposition s'effectuera, en général, d'une façon statistique, la probabilité pour qu'une liaison se rompe étant inversement proportionnelle à l'énergie de liaison : la quantité et la nature des produits de la radiolyse seront simplement liées à la quantité et à la nature des groupements parents dans la molécule.

Pour les états d'excitation égaux ou inférieurs au niveau d'activation de la liaison la plus forte, le mode de décomposition est plus ou moins influencé par la présence de certaines caractéristiques de structure dans la molécule, telles que des liaisons absorbant l'énergie d'excitation par résonance. Dans ce cas, la formation d'un seul produit est favorisée ; les réactions se rapprochent de celles de la photochimie.

Si la scission radiolytique de certains composés peut parfois s'effectuer par décomposition intramoléculaire, les fragments étant éliminés sous forme de molécules, dans la plupart des cas, la décomposition de la molécule excitée s'accompagne de la formation de radicaux libres.

Ces radicaux, en général très réactifs, interviennent sur d'autres radicaux ou des molécules situées à proximité.

Ce sont souvent ces réactions secondaires, telles que abstraction, recombinaison, dismutation, polymérisation, qui déterminent les effets terminaux.

Les molécules ionisées ont, en général, une durée de vie, et par conséquent une réactivité, intermédiaires entre celles des molécules excitées et des radicaux. Elles fournissent des réactions secondaires du type des réactions de radicaux ; on considère cependant que la majorité des molécules ionisées est neutralisée par des électrons libres sans formation de molécules fortement excitées.

Effet de protection « éponge ».

Certains composés, en particulier les substances aromatiques possédant une grande résistivité vis-à-vis des radiations, présentent la propriété de « protéger » un autre composé contre l'action du rayonnement. Cette protection est de nature physique et se place avant l'étape de la formation des radicaux libres.

La « protection » consiste dans le transfert de l'énergie d'ionisation ou d'excitation d'une molécule à la molécule protectrice. Ce transfert est possible à condition que le potentiel d'ionisation ou d'excitation de la molécule « protectrice » soit inférieur à celui de la molécule protégée. Si le corps protecteur dissipe cette énergie sans être transformé chimiquement, comme c'est le cas pour les composés aromatiques, l'énergie qui avait initialement conduit à l'excitation et l'ionisation du corps protégé n'a aucune conséquence chimique. On nomme cet effet du terme imagé de protection « éponge », le corps protecteur « épongeant » l'énergie absorbée par le corps protégé.

Radiolyse des solutions aqueuses.

Lorsqu'on irradie un composé en solution aqueuse, les effets obtenus sont essentiellement dus à l'action des radicaux, $H^{\cdot}$ et $OH^{\cdot}$, provenant de la décomposition d'une molécule d'eau excitée. Le rendement de ces réactions induites par le rayonnement augmente d'abord lorsque la concentration du corps croît, puis, dans un certain domaine de concentrations, il atteint un palier : l'énergie étant presque totalement absorbée dans l'eau, lorsque la concentration du corps est suffisante pour capter tous les radicaux issus de l'eau, il ne peut plus y avoir d'augmentation du rendement. Enfin, lorsque la solution devient très concentrée, une partie de l'énergie est absorbée directement dans les molécules du corps dissous et conduit à des effets qui peuvent être très différents de ceux observés en solution diluée.

D'une façon générale, le radical oxhydrile a un pouvoir oxydant suffisamment fort pour oxyder un grand nombre de substances. Mais d'un autre côté, l'hydrogène atomique est un réducteur puissant, si bien que ce qui a été oxydé d'un côté a tendance à être réduit de l'autre. Les composés facile-

ment oxydables seront donc oxydés avec des rendements plus ou moins grands selon que l'hydrogène atomique provoquera ou non une réaction inverse.

Irradiation des polymères.

Dans une macromolécule, l'énergie de radiation absorbée en un endroit déterminé peut être répartie dans une certaine mesure à l'intérieur de la molécule entre les résidus monomères voisins ; par suite de ce transfert, les réactions s'effectuent d'une façon moins anarchique que pour de petites molécules entre lesquelles les transferts d'énergie sont moins aisés et où les concentrations locales d'énergie risquent par conséquent d'être plus élevées.

Pour un grand nombre de polymères, les effets prédominants sont, ou la dégradation, ou la réticulation du polymère — accompagnés d'une transformation chimique des résidus monomères. Par exemple, se réticulent : le polyéthylène, le polyacrylonitrile, le caoutchouc naturel ; par contre, subissent une dégradation : le polyisobutylène, le polyméthracylonitrile, la cellulose.

Bien que les recherches effectuées jusqu'à présent sur l'irradiation des polymères n'aient pas encore permis d'établir d'une façon certaine la relation entre la structure du monomère et les effets d'irradiation, certaines règles ont pu être dégagées :

— les polymères du type $—CH_2—CR_1R_2—$ sont dégradés ;

— ceux du type $—CH_2—CR_1H—$ ou $—CH_2—CH_2—$ se réticulent

(R_1 et R_2 représentent des chaînes latérales).

La relation s'est révélée valable pour un grand nombre de polymères à squelette carboné.

Effets de l'intensité et de la dose du rayonnement.

Pour les polymères étudiés jusqu'à présent, les modifications conduisant à un raccourcissement ou à une réticulation des chaînes de polymères sont indépendantes de l'intensité du rayonnement dans un large domaine d'intensités. Dans le cas de l'irradiation du polyisobutylène, qui conduit à une dégradation de la chaîne, le même effet a été obtenu par des irradiations à une même dose délivrée soit par une source de radiations gamma en une journée, soit par un faisceau d'électrons en quelques secondes, soit encore par des radiations de pile atomique en quelques minutes (CHARLESBY, 1960).

Dans la plupart des cas, les modifications de la longueur de chaîne sont proportionnelles à la dose. Comme l'a fait remarquer CHARLESBY (1960), la dépendance linéaire entre la dose appliquée et l'effet induit se comprend aisément dans le cas de la dégradation : chaque interaction appropriée d'une particule ionisante conduisant à une seule rupture de chaîne.

Dans le cas de la réticulation, qui représente une réaction de synthèse secondaire, l'existence de cette relation linéaire impose certaines restrictions quant aux mécanismes impliqués. Comme la probabilité, pour que les deux molécules activées puissent apparaître assez près l'une de l'autre pour former une liaison, varie avec le carré de la dose, il convient de faire appel à l'une des deux hypothèses suivantes pour expliquer le mécanisme de la réticulation :

1° chaque réticulation implique un seul acte d'ionisation ou d'excitation, la molécule activée réagissant directement ou indirectement avec une molécule neutre voisine ;

2° chaque réticulation nécessite deux interactions séparées et indépendantes, mais les produits de réactions, par exemple des radicaux libres, sont suffisamment mobiles pour se mouvoir le long des chaînes, et d'une chaîne à une autre jusqu'à ce qu'ils se trouvent assez près l'un de l'autre pour la liaison de réticulation.

Les deux réactions doivent s'effectuer dans un temps très court excluant un effet de durée de l'irradiation en fonction de l'intensité du rayonnement.

Aspect statistique des modifications.

Les modifications induites par les radiations ionisantes en un endroit de la chaîne du polymère, se répètent le long de celle-ci. Dans la mesure où l'on peut négliger les effets spécifiques qui peuvent se produire aux extrémités des chaînes, la répartition des modifications induites se fait au hasard ; elle est statistique.

Une analyse mathématique détaillée de l'aspect statistique de la dégradation et de la réticulation des polymères a été donnée par CHARLESBY (1960).

Utilisant les données expérimentales d'un travail de SAEMAN et *coll.* (1952) sur l'irradiation de la cellulose, CHARLESBY (1955), à l'aide d'une équation qui relie la viscosité à la dose appliquée, a pu vérifier l'allure statistique de la dégradation de la cellulose. La relation déduite montre en même temps la possibilité d'utiliser l'irradiation des polymères comme méthode d'investigation indirecte dans leur physicochimie.

En raison de l'intérêt qu'elles présentent, nous voudrions indiquer brièvement les déductions de CHARLESBY :

Soit p la probabilité de rupture de chaîne par unité de dose. Pour un échantillon comprenant A_0 molécules dont le degré de polymérisation moyen est de u_1, le nombre de ruptures induites par une dose de radiations R sera de $A_0 p R u_1$, le nombre total des molécules augmentera de A_0 à $A_0 (1 + pRu_1)$.

Le poids moléculaire « moyen en nombre » M_n décroîtra de $u_1 m$ à $M'_n = \frac{u_1 m}{(1 + pRu_1)}$, où m est le poids moléculaire de l'unité monomère.

On pose $pu_1 = 1/R_0$, R_0 représentant la dose « virtuelle » de radiation nécessaire pour ramener une molécule d'un poids moléculaire infini au poids moléculaire initial. On aura alors :

$$M'_n = \frac{m}{p\,(R + R_0)} \tag{1}$$

Pour une distribution au hasard des poids moléculaires des polymères, il existe une relation simple entre le poids moléculaire obtenu par viscométrie M'_v et le poids moléculaire moyen en nombre M'_n :

$$\frac{M'_v}{M'_n} = (\alpha + 2)^{1/\alpha} \tag{2}$$

En introduisant dans cette expression la valeur de M'_n, on obtient :

$$M'_v = (\alpha + 2)^{1/\alpha} \frac{m}{p\,(R + R_0)} \tag{3}$$

La viscosité de la solution du polymère varie suivant l'équation:

$$(\eta) = K M'_v \tag{4}$$

En remplaçant M'_v de (4) dans l'équation (3) et en passant aux logarithmes, on a :

$$\log (\eta) = \log K + \frac{1}{\alpha} \log (\alpha + 2) + \log m/p - \log (R + R_0) \tag{5}$$

$$\log (\eta) = - \log (R + R_0) + \text{const.} \tag{5a}$$

Dans un système de coordonnées logarithmiques, les valeurs viscosimétriques obtenues expérimentalement pour la cellulose irradiée dans le domaine des doses allant de 0,5 à 100 rœntgens, se placent sur une droite : l'hypothèse d'une dégradation statistique se trouve ainsi justifiée.

La pente de la droite donne la valeur de « alpha » qui peut être comparée à des valeurs trouvées par d'autres méthodes (0,71 contre 0,77).

Par extrapolation des résultats à une dose de $R = 0$, on obtient la valeur de la dose « virtuelle » R_0. Connaissant la valeur de la constante K de la relation (4) qui peut être déterminée à l'aide de « alpha », la relation (5) permet de calculer le nombre de ruptures de chaînes par unité de dose, p. La valeur réciproque du produit pR_0, qui mesure le nombre d'extrémités de chaîne de la cellulose non irradiée, est égale au DP moyen de celle-ci. Pour les linters de coton, le DP ainsi évalué est de 625, contre 700, valeur obtenue par des méthodes classiques.

3. — Effets chimiques des radiations ionisantes sur l'amidon

31. — *Irradiation à l'état solide*

Nous allons examiner les différents travaux déjà effectués sur l'irradiation de l'amidon et de ses constituants.

Travaux de SAMEC (1959-1960).

L'amidon de pomme de terre a été soumis aux radiations gamma du ^{60}Co à des doses allant jusqu'à 2 Mrads. Les principaux résultats obtenus en fonction de la dose appliquée sont les suivants :

— le pouvoir réducteur, mesuré par la méthode à l'hypoiodite, augmente ;
— la fraction précipitable, qui représente l'amylopectine à haut poids moléculaire, diminue ;
— la viscosité des solutions diminue ;
— la fraction ultrafiltrable augmente.

Ces différentes observations mettent en évidence l'allure générale de l'action des radiations sur l'amidon, qui consiste dans une dégradation des chaînes polyosidiques.

L'auteur a constaté en outre que l'amidon irradié rétrograde en solution moins vite qu'un amidon de même viscosité, préparé d'après LINTNER.

Travail de KERTESZ et *coll.* (1958).

Les auteurs ont soumis aux radiations du ^{60}Co, jusqu'à des doses de 1,4 Mrads, l'amidon de pomme de terre et ses constituants. La teneur en eau des produits n'est pas précisée.

L'abaissement relatif de la viscosité spécifique de l'amidon, de l'amylose et de l'amylopectine irradiés isolément ainsi que celui de l'amylose et de l'amylopectine extrait de l'amidon irradié varie linéairement avec le logarithme de la dose, lorsque celle-ci est supérieure à 60 Krads.

Le pouvoir réducteur déterminé par la méthode à l'acide 2-4-dinitrosalicylique, augmente légèrement à partir d'une dose d'environ 100 krads.

Ainsi, la dégradation n'est appréciable qu'à partir d'une dose de 60 krads, et elle semble se faire de façon comparable pour l'amidon et ses constituants isolés ou non.

Travail d'EHRENBERG *et coll.* (1957).

Amidon, amylose de pomme de terre et amylopectine de maïs ont été soumis aux radiations du ^{60}Co pour des teneurs en eau variant d'environ 6 à 20 p. 100.

Cas de l'amidon :

Les auteurs constatent qu'une dose de 10^5 r suffit à rendre l'amidon de pomme de terre soluble dans l'eau.

Pour des doses situées entre 10 à 24 Mr, les teneurs en groupements réducteurs mesurées selon la méthode de SOMOGYI ne varient pas en fonction de la teneur en eau (entre 6 et 20 p. 100), alors que le nombre de groupements acides formés passe par un minimum entre 12 et 16 p. 100 d'eau. Entre 0,3 et 1 Mr, les mesures de viscosité spécifique indiquent que la dégradation est sensiblement deux fois plus importante pour l'amidon à 6 p. 100 d'eau que pour celui à 20 p. 100.

Cas de l'amylose :

Le nombre de ruptures de chaînes a été déterminé par une méthode indirecte basée sur l'absorption de l'iode par l'amylose, en prenant comme terme de comparaison l'amylose dégradée par l'alpha-amylase et dont le degré de polymérisation avait été estimé d'après le pouvoir réducteur. Ce mode opératoire suppose que, dans les deux cas, la dégradation des chaînes se fait au hasard.

A une dose de 30 Mr, le nombre de ruptures de chaînes varie dans le rapport de 2,5 à 1, quand la teneur en eau passe de 6 à 20 p. 100.

Cas de l'amylopectine :

Des mesures viscosimétriques indiquent qu'entre des doses de 0,2 et 1 Mr, la dégradation est 5 fois plus importante dans l'amylopectine à 5 p. 100 d'eau que dans celle à 20 p. 100.

Résumé : Les auteurs aboutissent ainsi à la conclusion que les différents effets induits n'évoluent pas de façon comparable en fonction de la teneur en eau.

Dans le cas des réactions de dégradation, l'eau exercerait un effet de « protection » : si l'on admet que l'absorption de 34,5 *e*V induit la formation d'une paire « d'ions » et l'excitation de 1 à 3 molécules, la variation de l'importance de dégradation observée en fonction de la teneur en eau peut être expliquée par un effet protecteur concernant seulement les molécules à l'état excité.

Travail de KOROTCHENKO *et coll.* (1960).

En traitant par les radiations gamma l'amidon de pomme de terre à 16 p. 100 d'eau, jusqu'à des doses de 18,5 Mr, les auteurs aboutissent aux résultats suivants :

— le pouvoir réducteur évolue proportionnellement à la dose ;

— la température d'empesage de l'amidon décroît en fonction de la dose : de 55°C, pour l'amidon non irradié, elle passe à 42,9°C pour une dose de 7,1 Mr et à 23,4°C pour 18,2 Mr ;

— la quantité de gaz formé, dont la nature n'a pas été déterminée, augmente rapidement avec la dose.

Travail de NIKUNI *et coll.* (1960).

Sur l'amidon de pomme de terre à 19 p. 100 d'eau, soumis à des doses d'irradiation gamma allant de 0,2 à 60 Mr, les auteurs ont déterminé :

— la viscosité intrinsèque dans la soude 1 N ;
— le pouvoir réducteur selon SOMOGYI ;
— l'acidité, par titration à la soude jusqu'à pH = 8,5 ;
— le nombre de groupements carbonyles, à l'aide de la méthode à l'hydroxylamine ;
— l'absorption de la coloration à l'iode.

Les résultats obtenus indiquent que les chaînes polyosidiques sont dégradées, qu'il y a formation de groupements acides et carbonyles ; les effets observés augmentent avec la dose. En outre, par chromatographie sur papier, le glucose, le maltose, l'acide glucuronique, l'acide gluconique, et l'arabinose ont pu être identifiés. La quantité de glucose libéré dans l'amidon irradié à 60 Mr a été estimée à 0,05 p. 100, par chromatographie sur colonne à échangeurs d'ions.

Les gaz formés au cours de l'irradiation ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse : H_2, CO, et CO_2 ont été identifiés.

Les diagrammes de diffraction aux rayons X montrent que la partie cristalline du grain d'amidon est endommagée de façon appréciable à partir d'une dose de 15 Mr.

Travail de RADLEY (1960).

Sur l'amidon de maïs, à une teneur en eau de 13,3 p. 100, irradié aux radiations cathodiques d'un générateur van de Graaf, à des doses entre 1-100 Mrads, l'auteur a déterminé en fonction de la dose appliquée l'évolution :

— du pouvoir réducteur ;
— de l'acidité ;
— de la coloration à l'iode.

Les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux des travaux précédemment décrits.

32. — *Irradiation en solution*

Travail de STACEY *et coll.* (1956).

Une solution d'amylose à 0,1 p. 100 a été soumise aux radiations gamma. Les doses appliquées ne sont pas précisées. Du déplacement du maximum d'absorption de la coloration à l'iode, les auteurs

concluent que la dégradation des chaînes polyosidiques de l'amylose en solution s'effectue essentiellement au hasard rappelant le mode d'action de l'alpha-amylase.

Par chromatographie sur papier, le glucose, le maltose, le maltotriose, un tétrose et le glyoxal ont été identifiés.

Travail de KOROTCHENKO *et coll.* (1959).

En comparant les effets des radiations ionisantes sur l'amidon natif et sur des amidons empesés, les auteurs constatent que l'amidon natif est dégradé en dextrines conformément à un mode de rupture statistique des liaisons, tandis que les gels d'amidon subissent une rupture préférentielle des extrémités de chaîne avec libération de glucose et d'autres sucres. Les résultats ne sont pas évalués quantitativement.

33. — *Résumé critique*

Afin de faciliter une comparaison ultérieure avec nos propres observations, les principaux résultats des différents auteurs, ramenés à une dose d'irradiation de 30 Mrads, sont indiqués dans le tableau I. Cette évaluation par interpolation ou extrapolation se justifie dans la mesure où les phénomènes évoluent proportionnellement à la dose, ce qui a été généralement constaté dans le domaine des doses considérées.

TABLEAU I

Principaux résultats des travaux antérieurs, extrapolés ou interpolés à une dose d'irradiation de 30 Mrads

Auteurs (année)	Source d'irrad., domaine de doses étudié	Matériel irradié	Eau (%)	D P	Sucres réd., (%)	Groupements carbonyles	Acides (%)
KOROTCHENKO (1959)	^{60}Co 1-18 Mr	Amidon de pomme de terre	16		1,95		pas d'acide
EHRENBERG (1957)	^{60}Co 10-30 Mr	Amidon de pomme de terre	6,4 13,2 16,0 20,8		2,84		1,26 0,88 0,81 2,26
—	—	Amylose	6,6 10,1 13,6 19,8	15,2 20,8 28,5 36			
NIKUNI (1960)	^{60}Co 1-60 Mr	Amidon de pomme de terre	18,5		3,8	5,0	3,7
RADLEY (1960)	Rayons cathodiques 1-10 Mrads	Amidon de maïs	13,3		3,04		1,43

Les résultats obtenus montrent une certaine concordance dans l'allure des évolutions globales observées. L'action des radiations ionisantes sur l'amidon conduit :

à la dégradation des chaînes polyosidiques ;
à une oxydation, avec formation de fonctions carbonyles et acides ;
à la formation de glucose et de certains de ses produits de transformation ;
à la formation de gaz.

Au point de vue quantitatif, la comparaison des résultats s'avère difficile, les produits étudiés et les conditions d'irradiation et d'examen étant généralement très différents. Cependant, il est possible de relever certaines divergences importantes : EHRENBERG signale une solubilisation de l'amidon de pomme de terre à partir d'une dose de 0,1 Mr, alors que KOROTCHENKO, pour une dose sensiblement 70 fois plus grande, trouve encore une température d'empesage de 43°C.

De plus, EHRENBERG, à partir de mesures viscosimétriques, constate une influence très différente de la teneur en eau sur l'importance de la dégradation de l'amidon de pomme de terre et de l'amylopectine de maïs, le nombre de ruptures de chaînes étant 2,5 fois plus élevé dans le cas de l'amylopectine, pour une même variation de la teneur en eau. Par contre, le comportement de l'amylose semble se rapprocher de celui de l'amidon.

Le tableau 1 fait ressortir les différences dans le pourcentage de groupements réducteurs mesurés ; selon les auteurs, les résultats passent de 1,95 à 3,8 p. 100 pour des produits à teneur en eau voisine. Ces écarts peuvent s'expliquer en partie par le fait que les réactifs employés pour le dosage ne sont pas spécifiques d'un groupement déterminé ; appliqués à un amidon non modifié, ils réagissent plus ou moins spécifiquement avec ses groupements aldéhydiques terminaux en fournissant des résultats comparables ; par contre, dans le cas de l'amidon irradié, les résultats seront différemment influencés par la présence de nouveaux groupements.

La quantité de groupements acides formés varie également d'un auteur à l'autre. Ces écarts proviennent sans doute de la présence de différents types d'acides, et éventuellement, de lactones donnant lieu à une variation de pH mal définie au cours de la neutralisation.

Cette somme de résultats déjà obtenue se présente ainsi sous une forme assez hétérogène, en raison du manque de spécificité de la plupart des mesures effectuées et de la disparité des conditions d'étude. Aucune conclusion précise ne peut en être dégagée quant aux mécanismes de réaction impliqués.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

Dans le but d'apporter une contribution à la connaissance de l'action des radiations gamma sur l'amidon, nous avons entrepris cette étude sur l'amidon de pomme de terre irradié à une dose de 30 Mrads, susceptible de fournir des modifications suffisamment nettes, et à des teneurs en eau choisies en fonction de nos connaissances sur l'état de fixation de l'eau dans l'amidon.

Nous nous sommes efforcés de préciser et compléter la caractérisation de l'amidon irradié, en utilisant certaines méthodes plus spécifiques que dans les travaux antérieurs. En outre, nous avons abordé l'étude du mécanisme des réactions en essayant de déterminer la nature des modifications induites dans les unités glucose et d'identifier les produits de dégradation de faible poids moléculaire.

Ainsi, dans une première partie, nous examinons l'évolution globale de certaines caractéristiques physico-chimiques et chimiques de l'amidon irradié :

— solubilité dans l'eau et dans le méthanol à 90 p. 100, à 20°C ;
— absorption ultraviolette ;
— DP moyen par viscosimétrie ;
— nombre de groupements fonctionnels formés ;
— nombre d'unités glucose modifiées.

Dans une seconde partie, nous abordons l'étude des modifications subies par les unités glucose des chaînes macromoléculaires. Après hydrolyse acide complète des liaisons glucosidiques de la fraction macromoléculaire de l'amidon irradié, les produits obtenus sont séparés par chromatographie sur papier, et caractérisés.

Dans une troisième partie, nous étudions les produits de faible poids moléculaire présents dans l'extrait, à l'alcool à 80 p. 100, de l'amidon irradié. La rupture des chaînes sous l'influence des radiations ionisantes s'effectuant d'une façon statistique, ces produits peuvent être considérés comme les témoins d'un type de dégradation déterminé, dans la mesure où ils n'ont pas subi de modifications ultérieures. Leur examen permettra ainsi d'aborder l'étude des mécanismes de la dégradation.

1. — Matériel et méthodes utilisées.

II. — Préparation et irradiation des échantillons d'amidon

Nous avons utilisé un amidon de pomme de terre préparé industriellement dont la teneur en eau initiale était de 15,7 p. 100. Des échantillons à différentes teneurs en eau ont été préparés à partir de l'amidon initial de la façon suivante :

— les échantillons à 0,8 et 3 p. 100 : par déshydratation contrôlée sous une pression de 10 à 20 mm de mercure, en présence de P_2O_5 ;

— ceux à 9,2 et 21,2 p. 100, respectivement par désorption et sorption dans une atmosphère à une humidité relative correspondante ;

— ceux à 40 p. 100 : par mélange avec la quantité d'eau suffisante et repos pour obtenir une hydratation homogène.

L'irradiation a été effectuée en ampoules de verre pyrex scellées. La source d'irradiation, mise à notre disposition par le Laboratoire de la Station de Technologie végétale de l'INRA (1) est constituée de 12 canaux en fer contenant des quantités de ^{60}Co déterminées, disposés selon les génératrices d'un cylindre au centre duquel est placé l'échantillon. Son activité est de 1 400 Curies et elle fournit un champ d'énergie homogène, les variations d'intensités d'énergie étant inférieures à 5 p. 100. Tous les échantillons ont reçu une dose d'irradiation de 30 ± 1,5 Mrads, le débit, mesuré par dosimétrie au sulfate ferreux, étant de 2,5 krads/minute.

12. — Méthodes d'analyse utilisées

Caractérisation globale de l'amidon irradié

Techniques physico-chimiques

Solubilité dans l'eau et dans le méthanol à 90 p. 100 à 20°C.

L'amidon non irradié étant complètement insoluble dans l'eau à température ordinaire, sa solubilisation partielle après irradiation constitue un premier indice de sa dégradation.

Solubilité dans l'eau.

Mettre en suspension 1 g d'amidon dans 10 ml d'eau à 20°C, dans un tube de centrifugeuse. Agiter pendant 15 minutes, puis centrifuger. Décanter la solution obtenue dans une capsule tarée. Répéter la même opération encore deux fois. Évaporer l'ensemble de l'extrait à sec, dans une étuve à infrarouge, peser le résidu après refroidissement.

Solubilité dans le méthanol à 90 p. 100.

Éluer dans une capsule 2 g d'amidon placés dans un tube étiré à une extrémité, avec 15 ml de méthanol à 90 p. 100. Évaporer l'extrait à sec sous vide et peser le résidu.

Mesure de l'intensité d'absorption à 262 mμ des solutions à 0,2 p. 100.

Les solutions de l'amidon irradié absorbent fortement la lumière ultraviolette. L'allure de la courbe est peu marquée, l'absorption étant maximale entre 257 et 268 mμ ; elle reste pratiquement identique pour les amidons à différentes teneurs en eau. Au contraire, l'intensité de l'absorption varie sensiblement.

Les densités optiques (DO) à 262 mμ des solutions à 0,2 p. 100 d'amidons irradiés en fonction de leur teneur en eau, sont mesurées dans des cuves de quartz de 1 cm d'épaisseur à l'aide d'un spectrophotomètre « Spectral Jouan ».

Détermination du DP moyen par viscosimétrie.

La plupart des méthodes physiques de détermination du poids moléculaire des macromolécules s'applique seulement à une série de polymères homologues d'une forme donnée, la propriété physique sur laquelle la méthode est basée évoluant selon une loi déterminée en fonction du DP du polymère étudié. L'amidon, étant un mélange de deux polymères dont les propriétés physiques varient différemment avec le DP, ne se prête pas à de telles mesures. En outre, l'osmométrie, méthode simple et applicable à des mélanges de polymères, ne peut être utilisée, étant donné la difficulté d'obtenir des membranes convenables pour des produits de poids moléculaire relativement faible (8 000 environ) qui sont à mesurer. L'utilisation de méthodes chimiques n'est plus justifiée, dans le cas de l'amidon irradié, en raison des nombreuses modifications des unités glucose. Nos déterminations ont été effectuées par une méthode indirecte, basée sur la viscosité, analogue à celle utilisée par Ehrenberg (1957) dans le cas de l'amylose irradié.

L'action de l'alpha-amylase bactérienne et celle d'un acide fort en faible concentration, sur l'amidon en solution, étant essentiellement statistique, la relation entre le DP mesuré par voie chimique et la viscosité établie pour les amidons dégradés par l'un ou l'autre de ces agents pourra servir

(1) Nous tenons à remercier particulièrement le personnel du laboratoire qui s'est chargé de l'irradiation.

à l'évaluation du DP d'un amidon irradié, à partir de mesures viscosimétriques. Ce procédé d'évaluation se justifie, dans la mesure où l'on peut négliger :

— d'une part, les divergences, par rapport à une action statistique, de l'action de l'alpha-amylase, de l'acide et éventuellement de celle des radiations ionisantes ;

— d'autre part, les variations de la viscosité dues aux modifications chimiques des résidus glucose de l'amidon irradié correspondant à un DP moyen donné.

Détermination de la courbe d'étalonnage : viscosité intrinsèque de l'amidon en fonction de son DP.

$$(\eta) = f\,(\mathrm{DP}) :$$

Mode opératoire.

a) Hydrolyse par l'alpha-amylase :

Laisser agir sur une solution d'amidon à 0,6 p. 100, à une température de 20°C en milieu non tamponné, une quantité d'alpha-amylase bactérienne permettant d'obtenir un DP moyen d'environ 20, en 12 heures. Prélever à des intervalles de temps convenables, des prises d'essais ; bloquer aussitôt l'action de l'alpha-amylase par addition d'une goutte d'acide sulfurique concentré.

b) Hydrolyse acide :

Chauffer une solution d'amidon à 0,6 p. 100 dans l'acide sulfurique 0,1 N, en ampoule scellée, au bain-marie bouillant pendant des temps permettant d'obtenir des DP entre 20 et 80 (1 à 3 h).

c) Mesure de la viscosimétrie :

Déterminer la viscosité dans un viscosimètre d'OSTWALD, muni d'un capillaire de 0,6 mm de diamètre, placé dans un thermostat réglé à 22°C ± 0,05. Chronométrer le temps d'écoulement de l'eau (t_o), et des solutions d'amidons dégradés diluées à une série de concentrations entre 0,1 et 0,6 p. 100 (tn).

d) Mesure du DP moyen :

Déterminer le DP moyen des chaînes d'amidon dans les solutions prélevées, par la méthode au chlorite.

Les viscosités spécifiques des solutions d'amidon dégradé $\eta = \frac{tn}{to} - 1$, évoluent linéairement avec la concentration, entre 0,1 et 0,6 p. 100 ; la valeur obtenue par extrapolation à une concentration de 1 p. 100 représente la viscosité intrinsèque (η).

Les résultats de la détermination de la variation de la viscosité intrinsèque de l'amidon en fonction de son DP sont rassemblés dans le tableau 2 et la figure 2.

TABLEAU 2

Viscosité intrinsèque et DP d'hydrolysats d'amidon obtenus

Par action de l'alpha-amylase		Par action de l'acide sulfurique 0,1 N	
(η)	DP	(η)	DP
0,124	33,3	0,125	33,3
0,153	47,5	0,139	38
0,171	56	0,158	46,6
0,191	62,5	0,175	53
0,204	68	0,228	81

Dans les limites des erreurs expérimentales, de l'ordre de ± 2 p. 100, on peut tracer une courbe unique pour représenter la variation de la viscosité en fonction du DP des produits hydrolysés par l'acide et l'alpha-amylase. Compte tenu des causes possibles de divergences par rapport à une action statistique :

— attaque des seules liaisons α-1,4 par l'alpha-amylase,
— libération préférentielle des unités glucose terminales par les acides,

Ce résultat nous semble montrer que, dans la zone des DP étudiés. ces réactions préférentielles n'ont qu'une influence négligeable sur la répartition statistique des fragments.

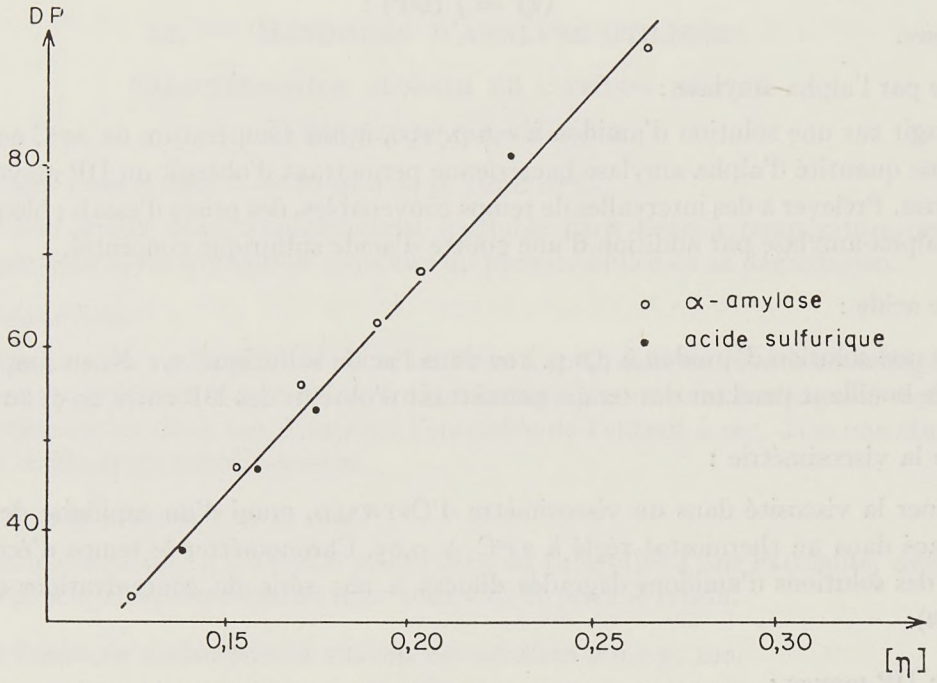


FIG. 2. — *Viscosité intrinsèque, en fonction du DP moyen, de solutions d'amidons hydrolysés par l'alpha-amylase ou l'acide sulfurique*

Méthodes de dosage chimique

Dosage de groupements fonctionnels.

Détermination des groupements aldéhydiques par la méthode au chlorite.

La méthode au chlorite, élaborée dernièrement par LAUNER et TOMIATSU (1959, 1961) semble être particulièrement adaptée pour l'étude des groupements aldéhydes de l'amidon modifié par oxydation. Contrairement aux méthodes habituellement employées, telles que celles à l'hypoiodite ou celles utilisant des sels de cuivre, nécessitant un milieu alcalin qui donne lieu à des dégradations et des suroxydations, la méthode au chlorite s'effectue en milieu acide où l'amidon et ses dérivés sont plus stables. De plus, elle est, dans une large mesure, spécifique du groupement aldéhydique.

Appliquée aux divers amidons non modifiés, elle est, parmi les méthodes chimiques, celle dont les résultats concordent le mieux avec les DP obtenus à l'aide de méthodes physiques. Dans le cas des amidons modifiés par oxydation periodique, sa validité pour la détermination des groupements aldéhydiques a été vérifiée.

Avec les amidons irradiés, on ne peut guère espérer que la méthode puisse permettre une détermination du DP en raison de l'existence possible de plusieurs groupements aldéhydiques sur une même macromolécule. Par contre, elle servira à déterminer le nombre de fonctions aldéhydiques.

Principe du dosage.

La réaction mise en jeu est la suivante :

$$RCHO + 3HClO_2 \rightarrow RCOOH + 2ClO_2 + HCl + H_2O$$

L'aldéhyde présente est déterminée indirectement par mesure de la quantité de chlorite ayant réagi.

Il y a lieu cependant de tenir compte du fait qu'au cours de la réaction, une partie du chlorite se décompose ; cette décomposition s'effectuant à des vitesses différentes suivant la présence ou non de l'aldéhyde et selon la nature de celle-ci. Dans ces conditions, il est nécessaire de déterminer expérimentalement le rapport de conversion R entre la quantité de chlorite apparemment consommée et le nombre de groupements aldéhydiques présents.

Connaissant la loi cinétique de la décomposition du chlorite, les auteurs précités ont établi la relation entre R et la concentration en aldéhyde dosée A_0 en fonction des concentrations en chlorite initiale C_i et finales correspondant à sa décomposition en présence d'aldéhyde, C_a et en son absence C_b :

$$R = \frac{1}{A_0}(C_b - C_a)\frac{C_i}{C_b}$$

Exprimée par rapport au volume de solution de thiosulfate utilisé pour la titration du chlorite, l'expression précédente devient :

$$R = \frac{1}{A_0}(V_b - V_a)\frac{V_i}{V_b} \cdot \frac{N}{4v}$$

où

N = normalité de la solution du thiosulfate,
v = le volume de la solution réactionnelle,
4 = le facteur de réaction entre chlorite et thiosulfate.

En étudiant les variations du rapport R avec la nature de l'aldéhyde à doser, les auteurs ont montré qu'elles sont réduites au minimum, en opérant en milieu tampon phosphate 3 M à pH = 3,2 à 50°C. A condition de rester dans les limites admises de concentrations en aldéhyde et en chlorite, R se situe, pour une grande variété d'aldéhydes, entre 2,56 et 2,73 ; les valeurs correspondant au glucose et au maltose sont de 2,66 et 2,56 respectivement. Dans le cas de l'amidon, les auteurs admettent une valeur de R correspondant à celle du maltose.

Connaissant R, la quantité d'aldéhyde peut être calculée à l'aide de l'expression précédente, à partir de la détermination de la concentration initiale en chlorite, C_i et de celles correspondant aux concentrations finales dans l'essai à blanc C_b et sans le milieu à étudier, C_a.

Pour une série de dosages, deux déterminations par dosage, celles du blanc et de l'essai suffisent, R, V_i V_b et N étant des constantes.

En posant $\frac{V_i \cdot N}{V_b \cdot 4\,R} = f$, l'expression précédente se transforme en :

$$Q = A_0V = f(V_b - V_a)$$

où Q = la quantité d'aldéhyde ayant réagi.

Description de la technique.

1° Matériel et réactifs :

— bain-marie thermostaté à 50°C ± 0,1°C ;
— tubes à essai pyrex, d'environ 2,5 cm de diamètre et 20 cm de haut, permettant d'effectuer la réaction à l'obscurité ;
— tampon phosphate donnant, après dilution 1/1, une solution 3 M à pH = 3,2 à 50°C : 828 g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ et 19,6 g H_2PO_4 à 85 p. 100 sont dissous dans 1 l d'eau.
— solution de chlorite : une solution stock 0,1 M est préparée par dissolution de 9,1 g de $NaClO_2$ dans 1 l d'eau ; la solution est diluée avant utilisation à 0,008 M environ ;
— acide sulfurique 6 N ;
— thiosulfate 0,01 N ;
— iodure de potassium ;
— aldéhyde : la concentration en aldéhyde doit être comprise entre 0,0001 M et 0,002 M.

2° Mode opératoire :

Introduire 10 ml de la solution tampon dans le tube à essai, puis 5 ml de la solution de chlorite et 5 ml de la solution contenant l'aldéhyde à doser. Fermer le tube par un capuchon constitué par une feuille d'aluminium par exemple et le placer dans un bain-marie à 50°C. Effectuer un essai à blanc dans des conditions identiques. Après réaction, refroidir les tubes dans un bain de glace. Chasser le ClO_2 par un courant d'azote pendant 10 minutes. Ajouter 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 6 N contenant 1,6 g d'iodure de potassium. Laisser réagir pendant 10 minutes et titrer l'iode libéré, par le thiosulfate 0,01 N.

Détermination des groupements carbonyles totaux.

En chimie des polyholosides, deux méthodes de dosage des fonctions carbonyles sont habituellement utilisées : la méthode au chlorhydrate d'hydroxylamine, $NH_2OH \cdot HCl$, et la méthode au borohydrure de sodium, $NaBH_4$.

La première est basée sur la titration du HCl libéré au cours de la réaction du chlorhydrate d'hydroxylamine avec les groupements carbonyles :

$$NH_2OH \cdot HCl + \diagup\!\!\diagdown C = O \rightarrow \diagup\!\!\diagdown C = NOH + HCl + H_2O$$

Dans le cas d'un amidon contenant des fonctions acides, les valeurs de titration du HCl doivent être corrigées.

Dans notre étude, nous avons choisi la méthode au borohydrure de sodium qui est basée sur la mesure manométrique de l'hydrogène consommé dans la réduction des groupements carbonyles :

$$NaBH_4 + 2H_2O \rightarrow NaBO_2 + 8H$$
$$\diagup\!\!\diagdown C = O + 2H \rightarrow \diagup\!\!\diagdown CHOH$$

Pour la plupart des produits carbonylés, la fonction carbonyle est facilement réductible à des pH supérieurs à 12, pH à partir desquels la solution de $NaBH_4$ reste stable pendant plusieurs heures. Par contre, la réduction des fonctions pseudo-aldéhydiques des sucres ne se produit à une vitesse convenable qu'à des pH inférieurs à 12. LINDBERG et THEANDER (1954), en étudiant les conditions optimales pour le dosage des sucres préconisent un pH situé entre 9 et 10 en milieu tampon borate

Étant donné l'autodécomposition du réactif, la réduction n'est quantitative qu'en présence d'un excès de celui-ci, qui, dans le cas du maltose par exemple, devra représenter trois fois la quantité théoriquement nécessaire pour la réduction complète.

Dans ces conditions, et à un pH voisin de 9,6, la réduction du maltose est quantitative en deux heures.

Description de la méthode.

Matériel et réactifs :

— ballon de 50 ml portant latéralement sur le col deux diverticules de 10 ml environ ;
— burette à gaz d'une capacité de 25 ml, graduée en 1/10 de ml ;
— bain-marie thermostaté à 20°C ;
— solution d'acide borique 0,133 M ;
— solution de $NaBH_4$ à 0,2 p. 100 dans NaOH 0,1 N ;
— solution d'H_2SO_4 6 N ;

Mode opératoire.

Peser 0,3 à 0,4 g d'amidon irradié dans le ballon à réaction ; y ajouter 5 ml de solution d'acide borique.

Pipeter exactement 5 ml de solution de $NaBH_4$ dans un des diverticules et 3 ml de solution sulfurique dans l'autre.

Placer le ballon dans le thermostat et le relier à la burette à gaz.

Attendre 15 minutes pour laisser l'équilibre thermique s'établir ; fermer le robinet de communication de la burette avec l'atmosphère.

Incliner le ballon pour introduire la solution de $NaBH_4$ sur l'amidon.

Laisser réagir pendant 2 heures en agitant de temps en temps.

Décomposer ensuite l'excès de $NaBH_4$ à l'aide de l'acide sulfurique en agitant fortement le ballon et en rinçant complètement le diverticule ayant contenu le borohydrure de sodium. Mesurer, à la pression atmosphérique, le volume d'hydrogène dégagé. Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Calcul des résultats.

La différence des volumes d'hydrogène dégagés dans l'essai à blanc V_b et l'essai V_e permet de calculer le nombre de groupements carbonyles réduits. Compte tenu des conditions de température T°K et de pression p (mm Hg), 1 ml H_2 utilisé dans la réduction correspond à :

$$\frac{1}{22{,}4} \cdot \frac{T}{273} \cdot \frac{p}{760} \text{ millimol de groupements carbonyles.}$$

Détermination des groupements acides.

La titration directe des fonctions acides d'un amidon modifié présente des difficultés : d'une part, les macromolécules de l'amidon perturbent, par interactions secondaires, la neutralisation ; d'autre part, les lactones et les fonctions carbonyles, toujours présentes en même temps que les fonctions acides, donnent naissance à une acidité supplémentaire, dès que le milieu devient alcalin.

Dans ces conditions, nous nous sommes efforcés de mesurer d'une part, l'acidité « libre » et, d'autre part, l'acidité développée en milieu alcalin.

Acidité libre.

Elle est déterminée par la méthode à l'acétate de calcium qui évite certaines difficultés d'une titration directe. Mis en suspension dans une solution d'acétate de Ca, l'amidon échange ses ions H^+ contre des ions Ca^{++} qui sont ainsi éliminés de la solution. Le dosage de l'acide acétique libéré dans la solution surnageante permet de mesurer l'acidité de l'amidon étudié.

Dans le cas de l'amidon irradié, les avantages de la méthode au Ca^{++} ne sont que partiellement conservés étant donné qu'une partie du produit se dissout. De plus, du fait que, suivant la teneur en eau, la quantité d'amidon soluble dans la solution d'acétate de Ca varie dans de larges limites (4. p. 100 pour l'amidon irradié en présence de 40 p. 100 d'eau, 75 p. 100 pour l'amidon à 0,8 p. 100), les résultats ne seront pas strictement comparables.

Mode opératoire.

Peser dans un tube de centrifugeuse 0,250 g d'amidon irradié ; les mettre en suspension dans 12 m d'une solution d'acétate de Ca 0,5 N. Laisser en contact pendant deux heures en agitant de temps en temps. Centrifuger et titrer un prélèvement de 10 ml de la solution avec de la soude 0,01 N, jusqu'au virage de la phénolphtaléine.

Acidité des solutions d'amidon irradié se développant en milieu alcalin.

Mode opératoire :

Préparer, dans un erlenmeyer de 50 ml, une solution de 0,250 g d'amidon irradié dans 20 ml d'eau, par chauffage vers 50°C. Refroidir la solution et chasser l'oxygène et l'acide carbonique par un courant d'azote. Ajouter 5 ml de NaOH 0,1 N et fermer le récipient avec un bouchon de caoutchouc. Bloquer l'action de la soude, à des intervalles de temps fixés, par addition de 5 ml de solution d'HCl 0,1 N. L'acidité de la solution est alors mesurée par titration potentiométrique jusqu'à pH = 8,5. En déduisant de ce résultat les valeurs de l'acidité « libre » trouvée, on obtient l'acidité développée en milieu alcalin.

Dosage des glucides totaux par l'anthrone.

Effectuée selon un mode opératoire déterminé, la réaction à l'anthrone en présence d'acide sulfurique, est spécifique des glucides en donnant naissance à des colorations très intenses qui sont dues aux produits de réaction de l'anthrone avec des dérivés furfuryliques. Les divers types de glucides, dans la mesure où ils forment des dérivés furfuryliques distincts, développent des colorations différant plus ou moins par leur teinte et leur intensité.

En suivant le mode opératoire élaboré par LOEWUS (1952) pour le dosage du glucose, l'amidon

non irradié est dosé à 100 p. 100 en utilisant la courbe d'étalonnage du glucose. Dans le cas de l'amidon irradié, le rendement du dosage évalué en glucose se trouve diminué ; on admettra que le déficit est dû surtout à l'existence de produits non glucidiques, sans cependant pouvoir fixer dans quelle mesure le rendement du dosage correspond à la somme du glucose et des unités glucose qui ne sont que peu modifiées.

La précision du dosage pour des quantités de 20 à 100 gamma de glucides est d'environ 1,5 p. 100.

Dosage du glucose après hydrolyse complète de l'amidon.

Le dosage du glucose, libéré après hydrolyse complète de l'amidon irradié, par oxydation spécifique en présence de glucose-oxydase, permet de déterminer le nombre d'unités glucose modifiées. L'amidon à la concentration de 1 p. 100 dans une solution sulfurique 1 N en ampoule scellée est hydrolysé à la température du bain-marie bouillant pendant trois heures. Le dosage du glucose est effectué selon la méthode élaborée par HUGETT et NIXON (1957).

Principe du dosage :

La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du D-glucose en gluconolactone, qui, réagissant avec une molécule d'eau, forme l'acide gluconique :

$$\text{glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}}, \text{ acide gluconique} + H_2O_2.$$

Simultanément, l'eau oxygénée formée, en présence de la peroxydase (POD), oxyde un donateur d'H_2 (par exemple le *o*-dianisidine) pour donner le colorant R :

$$H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{\text{POD}} 2H_2O + R$$

En somme, la réaction suivante se produit :

$$\text{glucose} + H_2O + RH_2 \xrightarrow[\text{POD}]{\text{GOD}} \text{acide gluconique} + H_2O + R$$

La quantité du colorant R formé mesure donc la quantité de glucose présent. La méthode permet le dosage de 10 à 60 gamma de glucose avec une précision de ± 1 p. 100.

Les conditions d'hydrolyse et de dosage ont été étudiées pour l'amidon non irradié : un rendement de 99 p. 100 a été obtenu, le déficit de 1 p. 100 représentant des produits d'inversion du glucose, notamment de l'isomaltose.

ÉTUDE DE LA PARTIE MACROMOLÉCULAIRE DE L'AMIDON IRRADIÉ

Dans cette partie de notre travail, nous abordons l'étude de la nature des modifications induites dans les unités glucose des chaînes macromoléculaires de l'amidon.

Après hydrolyse acide de l'amidon irradié, les produits obtenus sont examinés par chromatographie sur papier ; certaines des substances mises en évidence sont isolées par chromatographie préparative en vue de leur caractérisation.

Préparation

Mettre 1 g d'amidon irradié en suspension dans 10 ml d'alcool à 80 p. 100 ; agiter pendant 5 minutes, centrifuger. Décanter la solution et répéter la même opération encore deux fois pour obtenir la partie insoluble (fraction macromoléculaire I) de l'amidon.

Hydrolyse

Chauffer, dans un ballon à col rodé muni d'un réfrigérateur à reflux, 1 g de la fraction I dans 100 ml de solution sulfurique 1 N, pendant 2 heures au bain-marie bouillant. Refroidir la solution et neutraliser l'acide à l'aide du carbonate de Na jusqu'à un pH compris entre 4 et 5, évitant ainsi la neutralisation des acides faibles provenant de l'amidon irradié. Centrifuger et récupérer la solution.

Fractionnement de l'hydrolysat par chromatographie sur papier

1° *Examen qualitatif.*

Les essais ont été effectués sur papier Whatman n° 1, par écoulement descendant du solvant, dans une cuve de 60 cm de hauteur et 20 cm de diamètre placée dans une chambre thermostatée à 25°C.

La phase organique du mélange ternaire *n*-butanol/acide acétique/eau (4/1/5) est utilisée pour développer le chromatogramme saturé avec les vapeurs de la phase aqueuse du mélange.

Nous avons tiré avantage d'un dispositif mis au point dans notre laboratoire (DRAPRON, 1961) qui consiste essentiellement en un ventilateur permettant une homogénéisation rapide de l'atmosphère de la cuve. On obtient ainsi, en particulier, une saturation rapide du papier-support par les vapeurs de la phase aqueuse et une meilleure résolution des taches par suite d'une évaporation partielle du solvant provoquée par l'établissement d'un gradient de température dans la cuve.

Des taches correspondant à 500 gamma de produits sont déposées sur le papier. Après un développement d'environ 16 h, le chromatogramme est séché et les substances séparées sont révélées par pulvérisation d'un réactif approprié.

Composition des réactifs utilisés et conditions de révélation.

a) *Révélation des sucres et de leurs dérivés.*

— *Phtalate d'aniline :*

Dissoudre 1,66 g d'acide phtalique et 0,9 g d'aniline dans 100 ml de butanol saturé d'eau. Chauffer le chromatogramme dans une étuve à 100°C pendant 5 minutes.

Réactions des aldoses : coloration brune avec les aldohexoses — coloration rouge avec les aldopentoses.

L'hydroxyméthylfurfural réagit à température ambiante en donnant une coloration orangée.

— *Naphtorésorcine :*

Dissoudre 0,1 g de naphtorésorcine dans 100 ml de solvant composé de 80 ml d'alcool et 20 ml d'HCl 2 N.

Chauffer le chromatogramme à 75°C pendant 5 minutes.

Réactions : cétohexoses = coloration rouge ; acide glucuronique = coloration bleue.

L'hydroxyméthylfurfural (HMF) réagit à température ambiante en donnant une coloration rouge.

— *Diphénylamine :*

Dissoudre 2 g de diphénylamine et 5 g d'acide trichloracétique dans 100 ml d'un mélange 1 : 1 de *n*-butanol et de méthanol.

Chauffer le chromatogramme à 100°C pendant 5 minutes.

Réactions : Aldohexoses = coloration brune ;
Aldopentoses = coloration verte.

— *Periodate/Benzidine :*

Solution de 1 ml de métaperiodate dans 19 ml d'acétone ;

Solution de 0,184 g de benzidine dans 100 ml d'acétone contenant 0,6 ml d'acide acétique.

Immerger le chromatogramme dans la solution de periodate, laisser sécher pendant 10 minutes ; l'immerger dans la solution de benzidine.

La position des substances ayant réagi est marquée par une tache blanche sur le fond bleu du chromatogramme.

b) *Révélation des composés carbonylés.*

— *2,4-Dinitrophènylhydrazine:*

Dissoudre 0,1 g de 2.4-dinitrophénylhydrazine dans 100 ml d'alcool à 95 p. 100. On a formation d'hydrazone — coloration orange sur fond jaune avec :

— les composés à groupement carbonyle « libre », à température ambiante ;
— les cétoses, à 70°C ;
— les aldohexoses ne sont pas révélés.

c) *Révélation des acides.*

Dissoudre 0,03 g de rouge de méthyle dans 100 ml de borate de sodium 0,05 N. Après pulvérisation de la solution, les acides apparaissent en taches rouges sur un fond jaune.

2° *Chromatographie préparative.*

Les essais sont effectués sur papier Whatman n° 3 dans des cuves de 60 cm de longueur et 30 cm de largeur en utilisant le solvant précédemment indiqué.

Après concentration sous pression réduite, un volume contenant environ 1 g de substance sèche est déposé le long d'une ligne sur une feuille de dimensions 46 × 60 cm. Après développement, les substances sont repérées à partir de 2 bandes étroites détachées de la feuille et révélées au phtalate d'aniline. Les fractions du chromatogramme contenant les produits à examiner sont découpées et éluées par l'eau.

Caractérisation des substances séparées

Les techniques de caractérisation appliquées aux produits obtenus par chromatographie préparative sont indiquées au cours de l'exposé des résultats.

Étude des produits de dégradation de faible poids moléculaire

Préparation et fractionnement des produits par chromatographie sur papier

Peser 0,300 g d'amidon irradié dans un tube de 1 cm de diamètre, étiré à une extrémité. Éluer avec 10 ml de méthanol à 90 p. 100 dans une petite capsule. Évaporer le solvant sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 0,1 ml.

Déposer la solution en un point du papier-support en activant l'évaporation du solvant par un courant d'air froid (les produits étant sensibles à la chaleur). Rincer la capsule plusieurs fois avec du méthanol pour récupérer la totalité des produits.

La chromatographie est effectuée selon la technique décrite précédemment.

Identification et dosage du glucose

Identification :

En raison de sa faible proportion, le glucose présent dans l'amidon irradié ne pouvait être identifié par voie classique ; il est caractérisé d'une part par chromatographie, d'autre part par la réaction à la glucose-oxydase.

Dosage :

Le dosage du glucose est effectué à l'aide de la méthode à la glucose-oxydase (Huguett et Nixon, 1957). Comme il a été signalé par plusieurs auteurs, les préparations de glucose-oxydase ne sont pas strictement spécifiques, les perturbations étant surtout dues à la présence de traces de glucosidase qui libérerait des quantités notables de glucose dans le cas d'un substrat contenant une proportion élevée de polymères de glucose. Pour des quantités de glucose et glucides comparables, les erreurs sont généralement de l'ordre de 0,1 p. 100. Afin de réduire au minimum les perturbations, nous avons effectué le dosage sur l'extrait méthanolique de l'amidon irradié. Les résultats sont reproductibles dans les limites de ± 5 p. 100.

Identification et dosage du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF)

Identification :

Les déterminations suivantes ont été effectuées :

— repérage de la position de la tache sur le chromatogramme par rapport à la substance témoin ;
— réaction sur le chromatogramme avec le phtalate d'aniline et la naphtorésorcine ;
— spectre UV, après élution du produit séparé par chromatographie ;
— évaluation semi-quantitatitative du coefficient d'absorption.

Dosage :

Étant donné le coefficient d'absorption molaire élevé de 16 500, au maximum d'absorption à 282 mμ, le dosage du HMF par spectrophotométrie est très sensible et dans une large mesure spécifique ; une densité optique (DO) de 1 correspond à une concentration de 7,6 gamma HMF/ml.

Le HMF est dosé sur l'éluat aqueux de la substance séparée par chromatographie sur papier à partir d'un extrait méthanolique correspondant à 0,200 g d'amidon. L'absorption d'un essai à blanc du papier est de l'ordre de 0,02 DO par rapport à des DO de 0,30 à 0,60 mesurés pour les essais.

Pour examiner la validité du mode opératoire adopté, nous avons effectué une série de dosages du HMF témoin après un traitement identique à celui subi par le HMF présent dans l'amidon irradié : extraction au méthanol à 90 p. 100 de la substance adsorbée par l'amidon, chromatographie et élution de la bande de papier par l'eau. La récupération du HMF, après ces opérations, était en moyenne de 95 p. 100, la précision du dosage étant voisine de ± 5 p. 100.

La fidélité des résultats concernant la quantité de HMF existant dans l'amidon irradié est surtout fonction de l'efficacité de sa séparation, lors de sa chromatographie.

La présence d'impuretés dans la fraction du HMF se fait remarquer par une modification du maximum de l'absorption qui est élargi ou légèrement déplacé vers des longueurs d'onde plus courtes ; ce facteur de perturbation intervient surtout dans le cas des amidons à faibles teneurs en eau contenant davantage de produits de dégradation. Bien que les résultats soient reproductibles dans les limites de ± 5 p. 100, les vraies valeurs sont donc probablement inférieures aux valeurs obtenues, en particulier pour les amidons irradiés à faible teneur en eau.

Le HMF servant comme substance témoin a été préparé selon les indications de HAWORTH (1944).

Caractérisation du produit « P »

Présente en quantité relativement importante, dans l'extrait méthanolique de l'amidon irradié, la substance est caractérisée par sa position sur le chromatogramme, par rapport au glucose R_G, par ses réactions avec différents réactifs de révélation, ainsi que par son spectre UV.

2. — Résultats obtenus.

21. — CARACTÉRISATION GLOBALE

Les résultats sont indiqués dans le tableau 3 et les figures 3, 4 et 5 :

— solubilités dans l'eau et dans le méthanol à 90 p. 100 à 20°C, exprimées en poids de substance soluble par rapport au poids de substance sèche ;
— densité optique à 262 mμ de la solution aqueuse à 0,2 p. 100 d'amidon ;
— DP moyen déterminé par une méthode indirecte basée sur la viscosimétrie ;
— teneurs en groupements aldéhydiques, carbonyles et acides « libres », exprimées en mol p. 100 résidus glucose ;
— teneur en produits « non glucidiques » (ne réagissant pas à l'anthrone), exprimée en résidus glucose p. 100 ;
— pourcentage de résidus glucose modifiés (valeur corrigée par rapport aux produits d'inversion du glucose formés au cours du dosage,).

Aspect, solubilité dans l'eau

Au moment de l'ouverture des ampoules scellées, nous avons observé pour tous les échantillons irradiés, l'existence d'une pression de gaz assez importante.

Tous les produits étaient colorés, l'intensité de la coloration diminuant en fonction de la teneur en eau présente pendant l'irradiation : l'amidon à 0,8 p. 100 d'eau étant d'un jaune-brun, celui à 40 p. 100 étant à peine coloré.

Tous les échantillons donnent des solutions limpides dans l'eau à des températures situées entre 30° et 40°C, sauf le plus hydraté qui résiste davantage à l'action de l'eau, donnant des solutions légèrement opalescentes vers 50°C.

TABLEAU 3

Résultats obtenus sur l'amidon de pomme de terre irradié, à une dose de 30 Mrads, en fonction de sa teneur en eau

Teneurs en eau	Sol. dans l'eau à 20°C (% sub. sèche)	D. O. à 262 mμ d'une sol. à 0,2 %	Groupements en mol. % résidus glucose			
			Carbonyles	Aldéhydiques	Cétoniques (par diff.)	Acides
0,8	75	0,52	7,1	4,6	2,5	2,3
3,0	51	0,47	6,8	4,43	2,4	1,8
9,2	31	0,44	6,2	4,10	2,1	1,5
15,7	16	0,38	5,8	3,86	2,0	1,4
21,2	14	0,24	5,6	3,69	1,91	1,3
40,0	4	0,14	5,4	3,56	1,84	1,2
	Sol. dans le méthanol à 90(%sub. sèche)	Glucose formé (% sub sèche)	HMF formé (% sub. sèche)	DP moyen	Prod. non glucidiques (% résidus glucose)	Rés. glucose modif. (%)
0,8	1	0,009 5	0,005	43		
3,0	0,7	0,009 5	0,004 7	43		
9,2	0,5	0,009 5	0,004 3	43	6 ± 1,5	10 ± 1
15,7	0,3	0,014 0	0,002 9	43		
21,2	0,2	0,013 5	0,002 9	43		
40,0	0,5	0,12	0,002 8	81		

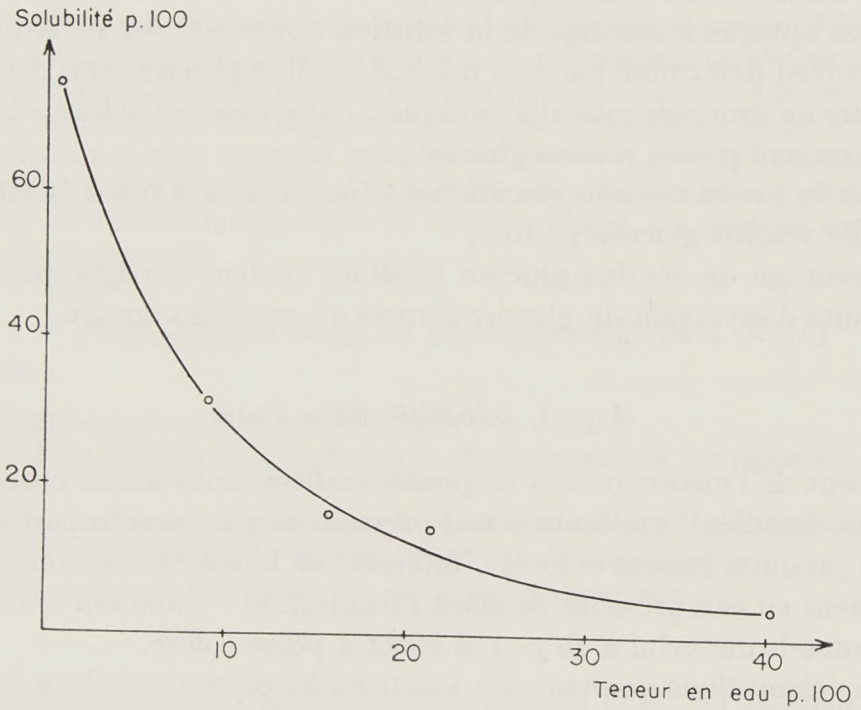


FIG. 3. — *Solubilité, dans l'eau à 20°C, de l'amidon de pomme de terre irradié à 30 Mrads en fonction de la teneur en eau*

Viscosité et DP moyen

La viscosité intrinsèque des solutions d'amidons irradiés à des teneurs en eau situées entre 0,8 et 21,2 p. 100 est identique dans les limites d'erreurs expérimentales :

$$(\eta) = 0{,}148$$

L'échantillon irradié à 40 p. 100 d'eau présente une viscosité plus élevée correspondant à :

$$(\eta) = 0{,}232$$

En se référant au graphique fournissant la relation entre la viscosité intrinsèque et le DP dans le cas d'amidon partiellement hydrolysé par l'acide sulfurique et l'alpha-amylase (fig. 2) on obtient :

— pour les échantillons de 0,8 à 21 p. 100 d'eau :
un DP de 43 ± 2 unités glucose ;
— pour l'échantillon à 40 p. 100 :
un DP de 81 ± 4.

Acidité développée en milieu alcalin

Les résultats exprimés en mol. p. 100 résidus glucose, sont indiqués dans le tableau 4.

22. — Étude de la partie macromoléculaire de l'amidon irradié

Examen de l'hydrolysat acide par chromatographie sur papier

Sur le chromatogramme de l'hydrolysat de la partie macromoléculaire des différents amidons irradiés (fig. 6) apparaissent, à côté du glucose représentant la majorité des constituants, deux taches :

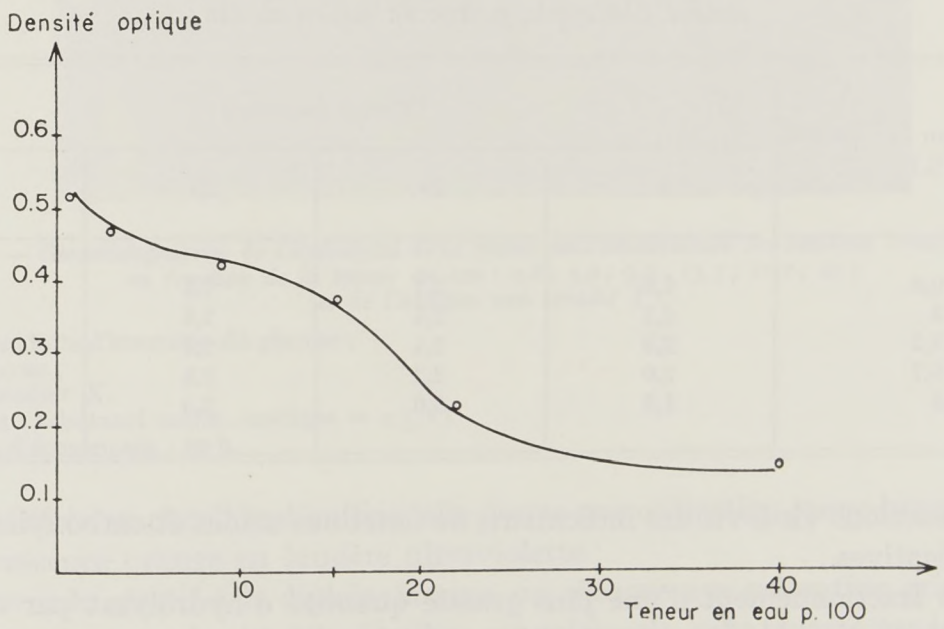


Fig. 4. — *Absorption à 262 mμ, des solutions d'amidon de pomme de terre irradiés à 30 Mrads en fonction de la teneur en eau (c = 0,2 p. 100)*

— l'une, moins mobile que le glucose, également présente dans l'hydrolysat de l'amidon non irradié, correspond à des produits d'inversion (probablement isomaltose) ;

— l'autre, plus mobile que le glucose, représentative d'une modification des unités glucose, est appelée « produit X ».

La quantité des produits d'inversion s'élève à environ 1 p. 100 ainsi que le montre le dosage du glucose présent dans l'hydrolysat de l'amidon non irradié.

La quantité du produit X n'a pu être évaluée ; d'après l'intensité des « spots » obtenus, elle est du même ordre de grandeur dans tous les échantillons quelle que soit leur teneur en eau.

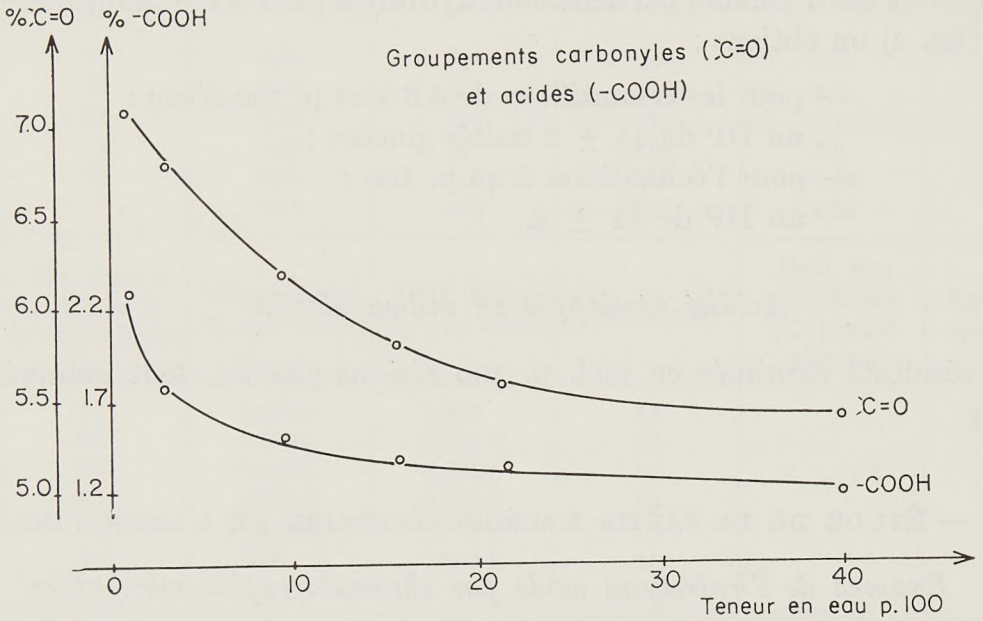


FIG. 5. — *Quantité de groupements carbonyles et acides formés dans les amidons de pomme de terre irradiés à 30 Mrads en fonction de la teneur en eau*

TABLEAU 4

Acidité développée, p. 100 en milieu alcalin

Teneur en eau de l'amidon (%)	Temps (minutes)			
	5	25	25	60
0,8	1,8	2,1	2,4	2,8
3	2,2	2,4	2,6	3,0
9,2	2,2	2,4	2,7	3,1
15,7	2,0	2,2	2,5	2,9
40	1,8	2,0	2,3	2,7

Les réactions vis-à-vis des indicateurs de fonctions acides et carbonyles « libres » ont été négatives.

Après fractionnement d'une plus grande quantité d'hydrolysat par chromatographie préparative, la chromatographie sur papier Whatman n° 1 permet de mettre en évidence la présence de plusieurs autres substances.

Caractérisation des produits isolés

Produit X.

Cette substance présente les caractéristiques suivantes :

— sa position sur le chromatogramme par rapport au glucose, $R_G = 1{,}27$, dans le solvant butanol-eau-/acide acétique = 4/5/1, est intermédiaire entre celle du xylose et de la glucuronolactone ou du 2-désoxyglucose (fig. 7).

— elle présente une réaction positive vis-à-vis du réactif au periodate ;

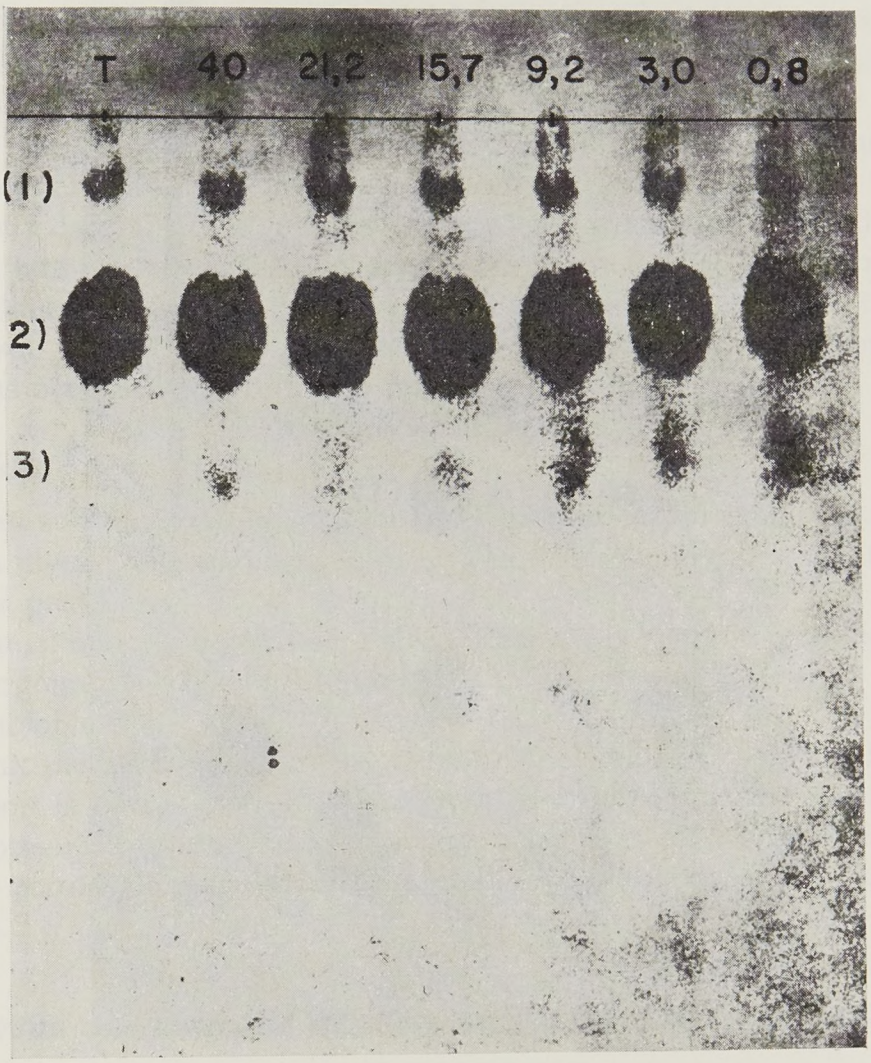


FIG. 6. — *Chromatogramme de l'hydrolysat de la partie macromoléculaire des amidons irradiés à 30 Mrads en fonction de la teneur en eau* : 0,8 ; 3,0 ; 9,2 ; 15,7 ; 21,2 ; 40 ; *et de l'amidon non irradié T :*

(1) : produits d'inversion du glucose ;
(2) glucose ;
(3) : produit X.
Solvant : *n*-butanol/eau/ac. acétique = 4/5/1 ;
Temps d'écoulement : 20 h.

— révélée au phtalate d'aniline, elle donne une coloration jaune-brun avec fluorescence orange en lumière ultraviolette ;

— avec le réactif à la diphénylamine, on observe une coloration gris-bleu.

La réaction avec le phtalate d'aniline est voisine de celle fournie par le 2-désoxyglucose et la glucuronolactone.

La coloration observée avec la diphénylamine n'est à notre connaissance indiquée dans la littérature pour aucune substance.

La substance ne porte pas de fonction carbonyle « libre » ; elle n'est pas non plus dérivée d'un cétose, la réaction vis-à-vis du réactif au 2,4-dinitrophénylhydrazine étant négative.

Par contre, la réduction au borohydrure de sodium aboutit à une substance de R_G pratiquement identique à celui du produit X, donnant une réaction positive au

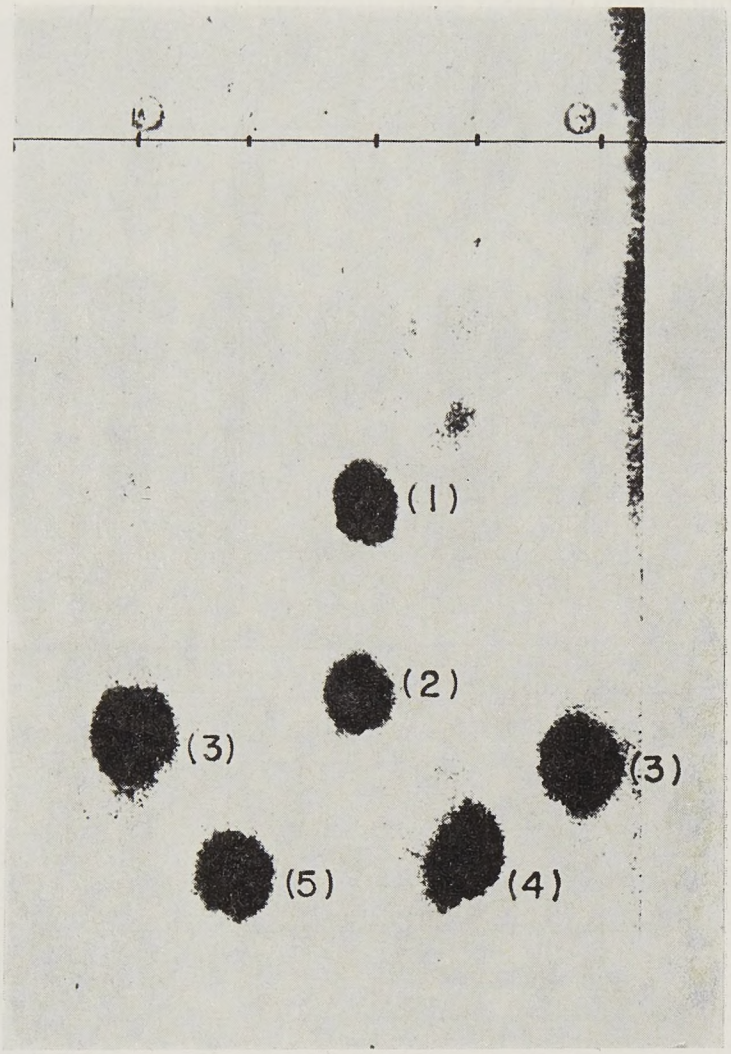


FIG. 7. — *Position sur le chromatogramme du produit X* (3) *par rapport :*

— au glucose (1),
— au xylose (2),
— à la glucuronolactone (4),
— au 2-désoxyglucose (5).
Solvant : *n*-butanol/eau ac. acétique = 4/5/1.
Temps d'écoulement : 48 h.

periodate/benzidine, mais qui ne présente plus de réaction au phtalate d'aniline. Or, cette dernière réaction est, entre autres, l'indice de la présence d'un groupement aldéhydique ou pseudoaldéhydique pour les dérivés des sucres. De plus, dans la série des sucres, les aldoses et les polyalcools correspondants ont pratiquement toujours une mobilité chromatographique presque identique. Les résultats de caractérisation

obtenus permettent ainsi de conclure que le produit X possède un groupement pseudo-aldéhydique et qu'il représente vraisemblablement un aldohexose modifié.

Un essai qualitatif dans le but de localiser cette modification a été effectué par oxydation periodique. Dans des conditions expérimentales qui, dans le cas du glucose, permettent par chromatographie de mettre en évidence de l'arabinose et du glycéraldéhyde comme produits intermédiaires, le produit X fournit également un pentose (coloration rouge avec le phtalate d'aniline) différent de l'arabinose ; cependant, il ne se forme pas de glycéraldéhyde, mais deux autres produits de R_G voisins de celle-ci.

Compte tenu du fait que le squelette du glycéraldéhyde, formé à partir du glucose, est constitué des carbones 4, 5 et 6 de l'aldohexose oxydé, les observations faites permettent de préciser la structure du produit X comme suit :

Libérés par hydrolyse acide des chaînes macromoléculaires de l'amidon irradié, les groupements liés aux carbones 1 et 4 ne sont très probablement pas modifiés par rapport à ceux du glucose. L'hydroxyle du carbone 5 doit être engagé dans l'hétérocycle ; aussi une modification à son niveau est peu probable. Par contre, il est très probable qu'une modification existe en position C_6 puisqu'il n'y a pas formation de glycéraldéhyde par oxydation periodique. On ne possède aucune indication sur les modifications éventuelles portant sur les carbones 2 et 3.

Autres produits.

Deux des substances isolées par chromatographie préparative se placent respectivement au niveau de l'arabinose et du xylose. Elles donnent les réactions caractéristiques des pentoses.

Bien que, d'une façon générale, l'identification par chromatographie sur papier, ne soit pas rigoureuse, l'identité des deux composés avec l'arabinose et le xylose est très vraisemblable.

Les deux pentoses sont présents dans tous les échantillons d'amidons irradiés, quelle que soit la teneur en eau. En raison de leur faible quantité, ils n'ont pu être dosés ; en première approximation, on peut cependant estimer que dans l'amidon irradié à 40 p. 100, ils représentent une proportion plus élevée que dans les autres échantillons.

23. — Étude des produits de dégradation de faible poids moléculaire

Séparation par chromatographie sur papier

La figure 8 représente le chromatogramme, révélé au phtalate d'aniline, des produits extraits, au méthanol à 90 p. 100, des différents amidons irradiés ainsi que les substances témoins glucose et HMF.

Plusieurs taches de substances apparaissent surperposées à une traînée de produits mal séparés.

L'intensité de la traînée augmente au fur et à mesure que l'hydratation de l'amidon irradié diminue, tandis que la quantité des différentes substances séparées évolue dans un sens ou dans l'autre.

Étant donné la complexité du mélange, une analyse complète des produits ne peut être entreprise dans ce travail.

Trois substances, présentes dans tous les échantillons irradiés, et relativement bien séparées, sont examinées en détail :

— l'une, au niveau du glucose ;
— l'autre, au niveau du HMF ;
— la troisième, le produit P. légèrement moins mobile que le HMF.

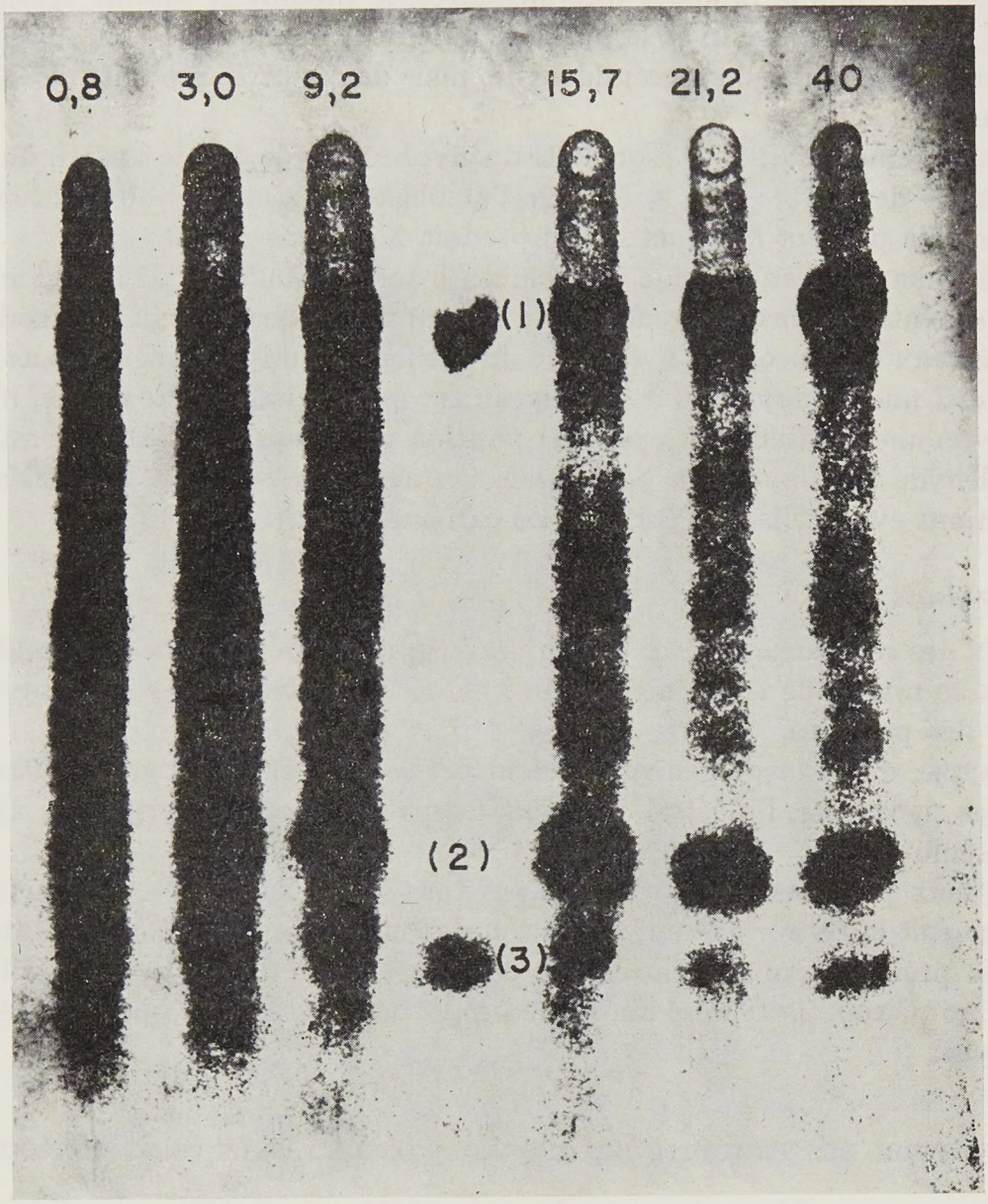


FIG. 8. — *Chromatogramme de l'extrait méthanolique des amidons irradiés à 30 Mrads en fonction de la teneur en eau :*

0,8 ; 3,0 ; 9,2 ; 15,7 ; 21,2 ; 40.

R = substances de référence (glucose-hydroxyméthylfurfural).
Positions : (1) du glucose,
(2) du produit P,
(3) du 5-hydroxyméthylfurfural.
Solvant : *n*-butanol/eau/ac. acétique = 4/5/1 ;
Temps d'écoulement : 20 h.

Identification et dosage du glucose

L'identité, avec le glucose, de la substance présentant un $R_G = 1$, est confirmée par sa réaction positive vis-à-vis de la glucose-oxydase. Les résultats de son dosage, en fonction de la teneur en eau de l'amidon irradié, sont indiqués dans le tableau 3.

Identification et dosage du HMF

Identification.

La substance qui se place sur le chromatogramme au niveau du HMF donne une coloration rouge brique avec le réactif à la naphtorésorcine et une coloration orange avec le phtalate d'aniline à température ambiante, caractéristique que seul, à notre connaissance, le HMF est susceptible de présenter à la fois.

Le spectre UV de la substance éluée à partir du chromatogramme montre un maximum d'absorption à 280 mμ très voisin de celui du HMF (281 mμ) ; l'allure de la courbe d'absorption est cependant plus ou moins modifiée par la présence d'impuretés non séparées (fig. 9).

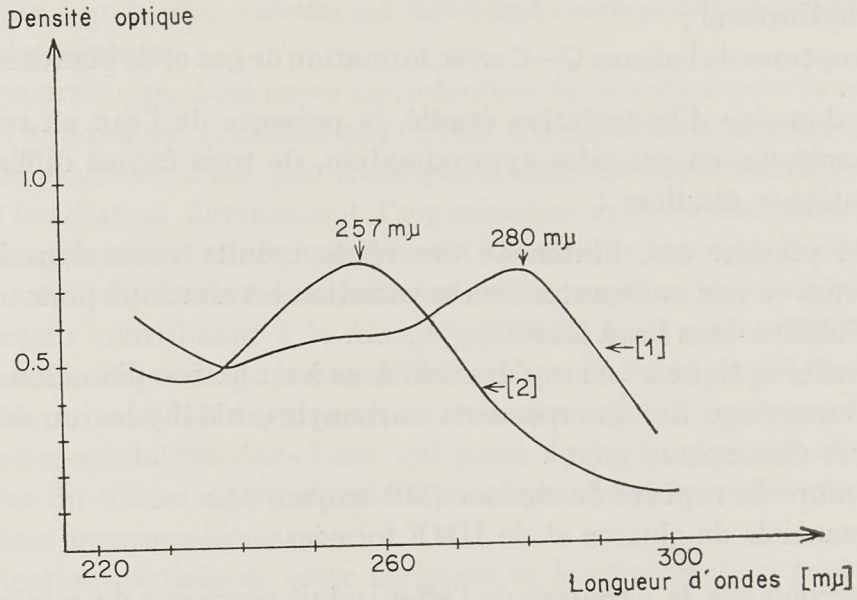


FIG. 9. — *Courbes d'absorption dans l'UV, des fractions « HMF » (1) et « P » (2).*

En outre, des quantités de la substance séparée et du HMF témoin, équivalentes vis-à-vis de l'intensité de leur coloration à la naphtorésorcine sur le chromatogramme donnent sensiblement la même absorption à 281 mμ.

Ces résultats, venant confirmer les réactions de caractérisation précédente nous semblent démontrer la présence de HMF.

Dosage.

Les résultats du dosage du HMF dans les échantillons d'amidons irradiés sont indiqués dans le tableau 3.

Caractérisation du produit P

La substance donne :

— une coloration jaune-vert avec le phtalate d'aniline,
— une coloration bleu-vert avec la naphtorésorcine.

Le spectre du produit élué du chromatogramme présente un maximum à 257 mμ (fig. 9). En milieu alcalin, l'absorption diminue, le maximum disparaît, le phénomène n'est pas réversible par réacidification du milieu, ce qui indique une transformation du produit sous l'action des alcalis.

3. — Discussion et interprétation des résultats

31. — Discussion d'ensemble

Globalement, les résultats obtenus indiquent que l'action des radiations gamma sur l'amidon conduit à la dégradation des chaînes polyosidiques accompagnée de modifications d'unités glucose qui comprendraient :

— des réactions d'oxydation, aboutissant à la formation de groupements carbonyles et acides ;
— des réactions de déshydratation, dont témoigne la présence de l'hydroxyméthylfurfural ;
— des ruptures de liaisons C—C avec formation de gaz et de pentoses par exemple.

Dans le domaine d'hydratation étudié, la présence de l'eau au cours de l'irradiation se manifeste, en première approximation, de trois façons différentes suivant les caractéristiques étudiées :

Dans un premier cas, l'intensité des effets induits varie dans le même sens pour des teneurs en eau croissantes ; cette variation est continue pour :

— la solubilité dans l'eau à 20°C ;
— la densité optique à 262 mμ des solutions à 0,2 p. 100 d'amidon ;
— le pourcentage des groupements carbonyles, aldéhydes et acides formés ; elle est discontinue pour :
— le nombre de rupture de chaînes (DP moyen) ;
— les quantités de glucose et de HMF formées.

Dans le second cas, la variation de l'effet induit passe par un minimum :

— solubilité dans le méthanol à 90 p. 100.

Dans le troisième cas, les effets induits restent indépendants de la teneur en eau :

— nombre d'unités glucose modifiées ;
— pourcentage de produits « non glucidiques » formés.

Nous nous proposons d'interpréter nos résultats en fonction de deux aspects :

— la dégradation des chaînes polyosidiques ;
— les modifications des unités glucose.

La dégradation des chaînes polyosidiques

Conclusions à partir des résultats de la solubilité de l'amidon irradié, dans l'eau à 20°C.

La solubilité partielle de l'amidon irradié, dans l'eau à 20°C, constitue une manifestation nette de sa dégradation. Mesurée en fonction de la teneur en eau présente au cours de l'irradiation, elle permet en outre de constater une influence profonde de l'eau sur les réactions impliquées dans la désorganisation de la structure physicochimique du grain d'amidon. Comme l'indique la variation du pourcentage de produits solubles qui passe de 75 p. 100 à 4 p. 100 dans le domaine d'hydratation de

0,8 à 40 p. 100, l'eau exerce un effet « protecteur ». L'insolubilité du grain d'amidon est généralement attribuée à l'existence des caractéristiques suivantes :

a) membranes externes et internes (GUILBOT et LEVAVASSEUR, 1959) ;

b) degré de polymérisation très élevé de la macromolécule ramifiée d'amylopectine, principal constituant de l'amidon ;

c) organisation d'un réseau intermoléculaire, assurée principalement par des liaisons hydrogène.

Après irradiation à 30 Mrads, nous avons observé, pour tous les amidons examinés, une fissuration du grain au niveau du hile. En outre, les DP moyens trouvés par viscosimétrie sont de 43 pour l'amidon entre 0,8 et 20 p. 100 d'eau et de 81 pour l'amidon hydraté à 40 p. 100, valeurs qui devraient correspondre à des polyholosides facilement hydrosolubles.

Ainsi, il apparaît que, dans notre cas, le facteur déterminant pour la solubilisation dans l'eau de l'amidon est constitué par l'état d'organisation physico-chimique du réseau macromoléculaire. C'est, par conséquent, dans la mesure où les modifications induites par l'irradiation diminueront l'organisation intermacromoléculaire, que la solubilité sera augmentée. Le raccourcissement des chaînes macromoléculaires, entraînant une diminution du nombre de liaisons interchaînes par macromolécule, constitue un premier facteur contribuant à la désagrégation de la structure physico-chimique du grain d'amidon. Cependant, bien que le nombre de ruptures de chaînes reste le même, les amidons irradiés à des teneurs en eau entre 0,8 et 21 p. 100 présentent une variation de leurs solubilités dans l'eau qui passe de 75 à 14 p. 100 ; il s'ensuit que l'affaiblissement du réseau intermoléculaire n'est pas simplement lié au raccourcissement des chaînes macromoléculaires.

Une explication partielle de cette variation de la solubilisation peut être recherchée dans l'accroissement du nombre de groupements $\rangle C - OH$ modifiés chimiquement dans l'amidon. En effet, la substitution des groupements $\rangle C - OH$ par des groupements $\rangle C = O$, par exemple, diminue le nombre et l'importance des liaisons hydrogène, la présence d'un atome H fixé à un atome fortement électronégatif (l'oxygène par exemple) étant essentielle pour la formation d'une liaison hydrogène. Or le pourcentage de groupement $\rangle C = O$ passe de 5,6 à 7,1 p. 100 dans le domaine d'hydratation de 8,0 à 21 p. 100.

Il nous semble cependant que l'effet le plus important intervenant dans la diminution de la solubilité de l'amidon, en fonction de sa teneur en eau, soit de nature physique. En effet, la solubilité diminue brusquement de 25 p. 100 en valeur absolue, lorsque la teneur en eau passe de 0,8 à 3 p. 100. Or, on a pu montrer que dans ce domaine d'hydratation, l'état d'organisation de la structure du grain d'amidon est encore incomplète. On pourrait ainsi émettre l'hypothèse, qu'après irradiation, l'amidon, initialement « amorphe », n'est plus apte à se réorganiser au contact de l'eau.

Conclusions à partir des résultats de la solubilité dans le méthanol à 90 p. 100.

Contrairement à la solubilité dans l'eau à 20°C, qui reflète l'état de désagrégation du grain d'amidon, la solubilité dans le méthanol mesure la quantité des produits de

dégradation de faible poids moléculaire (DP < 10 unités glucose) (fraction M). Les deux caractéristiques suivent la même allure jusqu'à une teneur en eau de 21,2 p. 100, la fraction soluble allant en diminuant.

Cependant, dans le domaine d'hydratation entre 21 et 40 p. 100, l'évolution des deux caractéristiques se distingue, la fraction M s'accroissant.

Si l'on admet qu'entre 0,8 et 21 p. 100, l'action des radiations est statistique, compte tenu du DP moyen mesuré et des faibles quantités de « produit de dégradation » formées — de l'ordre de 0,5 p. 100 — cette action est sûrement moins statistique à une hydratation de 40 p. 100, puisque, pour un DP plus élevé, la teneur en fraction M est sensiblement plus grande qu'à une hydratation de 21,2 p. 100.

D'une façon plus précise, on observe la diminution de la fraction M pour des amidons à des teneurs en eau croissantes jusqu'à 21,2 p. 100, sans doute en raison de la présence dans l'amidon peu hydraté d'un nombre de groupements carbonyles plus élevé.

Par contre, l'augmentation de cette fraction avec l'amidon à 40 p. 100 d'eau doit être recherchée dans l'existence de réactions spécifiques en cours d'irradiation.

Ces déductions sont confirmées par le calcul de la part que représente le glucose dans la fraction M. Pour les différents amidons examinés, ces chiffres sont indiqués dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Teneurs en eau de l'amidon (%)	Glucose dans la fraction M (%)
0,8	0,95
3	1,35
9,2	1,75
15,7	4,5
21,2	7
40	24

Pour des amidons présentant des teneurs en eau jusqu'à 21,2 p. 100 et surtout jusqu'à 9,2 p. 100, la contribution du glucose à la fraction M est, en première approximation, compatible avec une répartition statistique des produits de dégradation, indiquant une action directe des radiations sur l'amidon. Sa proportion élevée (24 p. 100), dans la fraction M de l'amidon irradié à 40 p. 100 d'eau, montre que les réactions spécifiques constatées consistent principalement dans la libération préférentielle du glucose qui s'effectue, sans doute, par intervention de l'eau, sur les résidus glucose terminaux des chaînes ; les réactions induites rappellent ainsi le mode d'action des acides sur l'amidon.

Calcul statistique de la quantité de glucose formé pour un nombre donné de scissions hydrolytiques.

La comparaison des quantités de glucose dosées avec celles calculées à partir des données statistiques, en admettant que toutes les ruptures de chaînes s'effectuent

par voie hydrolytique, va nous permettre d'obtenir des renseignements supplémentaires quant à l'importance des scissions « hydrolytiques » par rapport à d'autres types de scission.

Dans la discussion qui va suivre, le terme scission « hydrolytique » désigne un mode de ruptures de chaînes polyosidiques faisant intervenir les radicaux H et OH, sans préjuger de l'intervention éventuelle des molécules d'eau d'hydratation.

Nous nous référons au calcul effectué par KUHN (1930) dans le cas de l'hydrolyse acide de la cellulose.

Soit une chaîne de N + 1 unités, N représentant le nombre de liaisons. Si r liaisons sont rompues, le degré de dégradation est égal à :

$$a = \frac{r}{N}$$

La probabilité d'obtention d'un fragment à n unités est égale au produit des probabilités pour que, par exemple, les q-ièmes et $q + (n - 1)$-ièmes liaisons ne soient pas rompues.

La probabilité de rupture d'une liaison est égale au rapport (a) des liaisons présentes aux liaisons rompues, la probabilité de non rupture est égale à $(1-a)$. La probabilité d'obtention d'un fragment à n unités est donc :

$$P = a^2 (1 - a)^{n-1}$$

Le nombre de tels fragments, qui peuvent se former à partir d'une chaîne à N + 1 unités, est égal à la somme des fragments que l'on obtient en faisant varier q entre 0 et N $(N + 1 - n)$.

$$A = (N + 1 - n)a^2 (1 - a)^{n-1}$$

Le rendement en fragments à n unités par rapport à une rupture uniforme de la chaîne est égal à :

$$R = \frac{A}{\frac{N}{n}} = \frac{n}{N} (N + 1 - n)a^2 (1 - a)^{n-1}$$

Comme n est, en général, négligeable devant N, la formule se simplifie, soit :

$$R = na^2 (1 - a)^{n-1}$$

Dans le cas du rendement en glucose, $n = 1$, on a :

$$R = a^2$$

Cette formule est valable pour des chaînes très longues, la contribution des unités terminales au rendement étant négligée. Dans le cas de l'amidon, en raison des nombreuses ramifications de l'amylopectine, la formation de glucose à partir des unités glucose terminales, représentant un pourcentage de 4 p. 100, doit être considérée.

Comme dans la formation du glucose à partir de l'extrémité d'une chaîne polyosidique, une seule liaison est rompue, son rendement est égal à :

$$R = a$$

Négligeant dans le calcul la formation du glucose à partir des résidus glucose ramifiés dont la libération demande la rupture de trois liaisons, le rendement en glucose résultant d'une hydrolyse de l'amidon de pomme de terre se calculera ainsi en bonne approximation d'après l'expression suivante :

$$R = \frac{4}{100} a + \frac{96}{100} a^2$$

Le degré de dégradation (a) est déterminé par les DP moyens initial $N + 1$ et final $N_1 + 1$:

$$a = \frac{r}{N} = \frac{\frac{N - N^1}{N_1 + 1}}{N} = \frac{N - N_1}{(N_1 + 1) N}$$

Si le DP final N_1 peut être négligé devant N, on a :

$$a = \frac{1}{N_1 + 1}$$

Dans le cas des amidons irradiés à des teneurs en eau allant jusqu'à 21,2 p. 100, le DP mesuré est égal à 43. En admettant un DP initial de 1 000, la quantité de glucose libéré serait de :

$$R = \frac{4}{100} \cdot \frac{999 - 42}{43 \cdot 1000} + \frac{96}{100} \left(\frac{999 - 42}{43 \cdot 1000}\right)^2$$

$$R = 0{,}000\,88 + 0{,}000\,47$$

$$R \# 0{,}13 \text{ p. } 100.$$

En admettant un DP initial infini, le rendement en glucose serait :

$$R = \frac{4}{100} \cdot \frac{1}{43} + \frac{96}{100} \left(\frac{1}{43}\right)^2$$

$$R \# 0{,}144 \text{ p. } 100$$

Les quantités de glucose formé dans les amidons irradiés sont de :

0,0095 p. 100 à des teneurs en eau de 0,8-3 et 9,2 p. 100 ;

0,0135 p. 100 à des teneurs en eau de 15,7 et 21,2 p. 100.

Le calcul effectué montre donc que la scission « hydrolytique » n'est pas le seul mode de rupture de chaînes, le rendement étant environ dix fois plus faible que dans le cas d'une hydrolyse. En outre, le résultat reste compatible avec un mode de dégradation statistique.

Par contre, dans le cas de l'amidon irradié à 40 p. 100 d'eau, la quantité de glucose calculée :

$$R = \frac{4}{100} \cdot \frac{1}{80} + \frac{96}{100} \left(\frac{1}{80}\right)^2$$

$$R \# 0{,}065 \text{ p. } 100$$

est inférieure à celle trouvée expérimentalement : 0,12 p. 100.

La formation du glucose doit donc s'effectuer par des réactions spécifiques. Ce résultat rejoint ainsi nos précédentes déductions.

Modes possibles de ruptures de chaînes.

D'une façon générale, les substances présentes dans la fraction soluble dans le méthanol peuvent être considérées comme les témoins types de dégradation des chaînes macromoléculaires, dans la mesure où elles résultent d'une scission directe ;elles peuvent ainsi fournir des indications sur les mécanismes des réactions de dégradation.

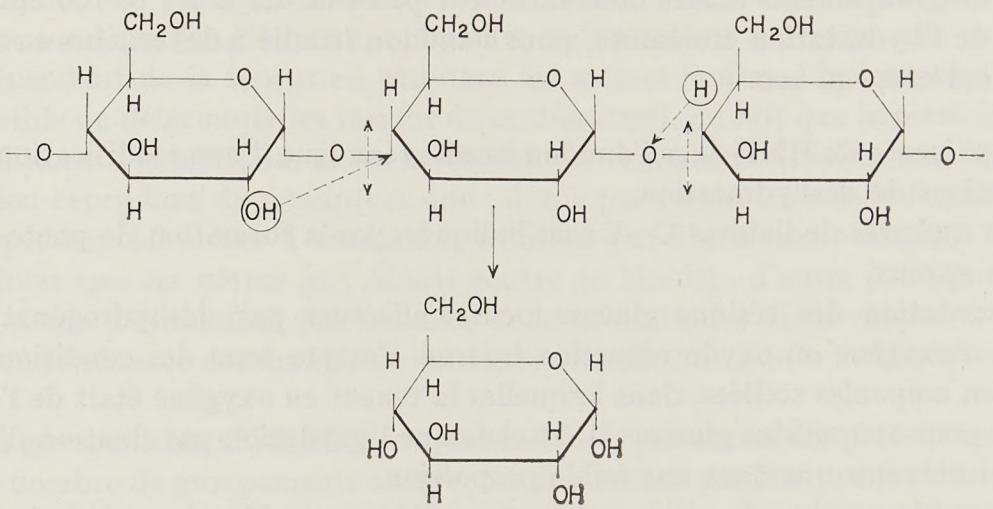
Parmi les produits de dégradation de l'amidon irradié en fonction de la teneur en eau, le glucose et l'hydroxyméthylfurfural ont été identifiés ; leurs proportions respectives et leur évolution permettent de penser qu'ils représentent de tels témoins. La réaction de dégradation indiquée par la présence du glucose est caractérisée comme suit : elle se produit au niveau de la liaison glucosidique ; elle fait intervenir les radicaux H et OH.

Ces radicaux peuvent avoir deux origines :

— les molécules d'eau présentes dans le milieu ;

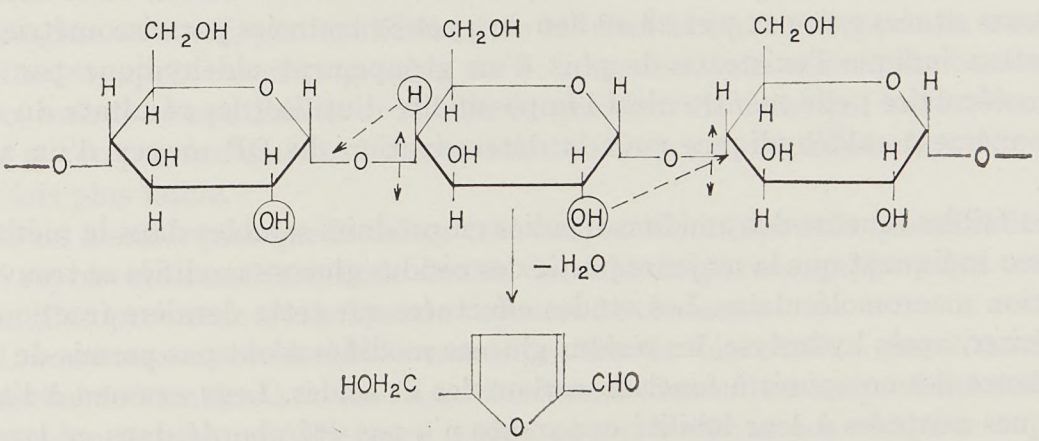
— les groupements H et OH des unités glucose voisines de l'unité détachée.

Dans le deuxième cas, chaque scission, entraîne ainsi la modification d'une unité glucose, selon le schéma suivant, par exemple :



Les modifications ainsi produites peuvent aboutir à la formation d'une double liaison ou à un résidu glucose déshydraté.

Le HMF constituant un dérivé de déshydratation du glucose est en rapport avec la scission des liaisons glucosidiques. Unrési du glucose détaché de la chaîne polyosidique par la rupture « hydrolytique » de deux liaisons glucosidiques voisines pourrait se stabiliser par élimination d'une autre molécule d'eau en formant du HMF (voir schéma) :



Ce mode de dégradation permettrait d'expliquer une partie de la différence observée entre le rendement en glucose calculé statistiquement dans le cas d'une hydrolyse et les teneurs en glucose mesurées pour les amidons irradiés à des hydratations situées entre 0,8 et 21,2 p. 100.

On peut également formuler l'hypothèse que le produit P, présent en quantité relativement grande dans la fraction M, constitue le témoignage d'un autre type de dégradation.

Les modifications des résidus glucose

Le nombre de résidus glucose « modifiés » dans l'amidon irradié à 30 Mrads est de 10 ± 1 p. 100, dont environ 6 ne fournissent plus de dérivés furfuryliques détectables par le dosage à l'anthrone.

Plusieurs types de modifications ont été mis en évidence : la grande majorité d'entre elles consiste en réactions d'oxydation aboutissant à la formation :

— de groupements carbonyles dont le pourcentage varie entre 5,4 et 7,1 p. 100 ;
— de groupements acides dont la teneur passe de 1,2 à 2,3 p. 100 en fonction de l'hydratation croissante, pour l'amidon irradié à des teneurs en eau entre 0,8 et 40 p. 100.

La présence de HMF dans l'amidon irradié témoigne d'une modification suivant des réactions de déshydratation.

Des ruptures de liaisons C—C sont indiquées par la formation de pentoses et de produits gazeux.

L'oxydation des résidus glucose peut s'effectuer par déshydrogénation, par fixation d'oxygène ou oxydo-réduction interne. Compte tenu des conditions d'irradiation en ampoules scellées. dans lesquelles la teneur en oxygène était de l'ordre de 1 atome pour 100 résidus glucose, il est clair que l'oxydation par fixation d'oxygène ne peut intervenir que dans une faible proportion.

Comme le nombre de résidus glucose modifiés reste identique dans le domaine d'hydratation étudié, l'évolution du nombre de groupements carbonyles et acides en fonction de la teneur en eau permet de penser qu'au fur et à mesure que l'hydratation diminue les unités glucose sont oxydées à un degré plus élevé ; c'est-à-dire qu'une interaction des radiations avec une unité glucose conduit à des réactions d'oxydation plus importantes. En calculant le DP moyen des amidons irradiés à partir du nombre de groupements aldéhydiques, déterminé par la méthode au chlorite, on obtient alors des valeurs situées entre 21,7 et 28 au lieu de 43 et 81 trouvées par viscométrie. Cette observation indique l'existence de plus d'un groupement aldéhydique par chaîne macromoléculaire ; elle montre ainsi l'impossibilité d'utiliser les résultats du dosage des groupements aldéhydiques pour la détermination du DP moyen d'un amidon irradié.

Les faibles teneurs des amidons irradiés en produits solubles dans le méthanol à 90 p. 100 indiquent que la majeure partie des résidus glucose modifiés se trouve dans la fraction macromoléculaire. Les études effectuées sur cette dernière fraction, pour caractériser, après hydrolyse, les résidus glucose modifiés n'ont pas permis de mettre en évidence des composés à fonction carbonyles et acides. Leur examen à l'aide de techniques adaptées à leur labilité apparente n'a pas été abordé dans ce travail.

Un type de modification important semble être lié à la structure du produit X, compte tenu des quantités observées après chromatographie sur papier.

Seuls l'arabinose et le xylose ont été identifiés. Étant donné les faibles quantités qui ont pu être décelées, nous n'avons pas formulé d'hypothèses sur leurs modes de formation d'autant plus qu'il n'a pas été possible de déterminer, si elle est impliquée ou non dans les réactions de dégradation.

32. — Confrontation avec les résultats des travaux antérieurs

Dans l'étude, effectuée par Ehrenberg (1957), concernant l'influence de la teneur en eau sur les modifications induites par les radiations gamma dans l'amidon et ses constituants, aucun échantillon n'a été examiné à des teneurs en eau inférieures à 6 p. 100. Comme le montrent nos résultats, c'est précisément dans la zone de très faible hydratation que les variations des effets induits, avec la teneur en eau, sont les plus importants.

Ehrenberg a trouvé une diminution du nombre de ruptures de chaînes au fur et à mesure de l'accroissement de l'hydratation entre 6,6 et 20 p. 100. Nos résultats sur l'amidon de pomme de terre indiquent au contraire que ce nombre est indépendant de la teneur en eau dans les mêmes limites d'hydratation. Il n'est pas possible de déterminer les raisons de ce désaccord, du fait que le matériel utilisé, les conditions d'irradiation, et les méthodes de détection utilisées sont différents. Il y a lieu cependant de remarquer que : d'une part, dans les cas de l'amidon et de l'amylopectine, les doses d'irradiation utilisées par Ehrenberg étaient beaucoup plus faibles que les nôtres (0,5 Mrads contre 30 Mrads) ; d'autre part, pour l'amylose, le mode d'évaluation par examen de la coloration à l'iode risque d'être plus sensible à l'influence des modifications des résidus glucose que la méthode viscosimétrique.

Les groupements aldéhydiques n'ont été dosés par aucun des précédents auteurs.

Le nombre de groupements carbonyles déterminés par Nikuni (1960), d'après la méthode à l'hydroxylamine, pour des amidons à une teneur en eau de 18,5 p. 100, est de 5,0 p. 100 à une dose de 30 Mrads (valeur obtenue par interpolation). La méthode au borohydrure nous a fourni des valeurs situées entre 5,8 et 5,6 p. 100 pour des amidons irradiés respectivement à une teneur en eau de 15,7 et 21,2 p. 100, à la même dose.

Nos résultats du dosage des fonctions acides sont voisins de ceux des précédents auteurs.

Le glucose libéré, par irradiation à 60 Mr d'un amidon à 18,5 p. 100, a été estimé par Nikuni, après chromatographie sur échangeurs d'ions sous forme borate, à 0,05 p. 100, valeur compatible avec l'ordre de grandeur de celle que nous avons trouvé (0,014 p. 100 pour un amidon à 21,2 p. 100 d'eau) compte tenu de la dose d'irradiation deux fois plus faible.

Il est à remarquer que la valeur trouvée par Nikuni pour la quantité de maltose libéré représente sensiblement le double de celle du glucose, rapport qui correspond à celui d'un processus statistique de ruptures de chaînes.

L'arabinose a été identifié comme produit de dégradation, par Nikuni, après irradiation de l'amidon à 60 Mr ; il a été mis en évidence dans les produits d'hydrolyse de l'amidon irradié par Wolfrom (1962), ce qui confirme nos résultats.

Les autres déterminations effectuées au cours de cette étude n'ont pas fait l'objet de travaux antérieurs ; notamment il n'existe pas d'indications sur la présence de l'HMF, ni sur la formation au cours de l'hydrolyse de l'amidon irradié d'une substance ayant les propriétés du produit X. Cependant, il est intéressant de noter que WOLFROM indique la présence de 1,6-anhydroglucose dans les produits de dégradation.

33. — HYPOTHÈSES CONCERNANT LE MODE D'ACTION DES RADIATIONS GAMMA SUR L'AMIDON EN FONCTION DE SA TENEUR EN EAU

En général, les effets finaux observés après irradiation d'un système binaire sont différents de la somme des effets obtenus par irradiation des composants. Ils constituent plutôt la résultante de l'action directe et de diverses interactions, de nature physique et chimique, entre les molécules activées et neutres des constituants.

Les interactions physiques, se plaçant avant l'étape des réactions chimiques, consistent, par exemple, en une action des molécules neutres d'un constituant sur les molécules activées de l'autre ; elles aboutissent ainsi soit à un effet de sensibilisation soit à un effet de protection, suivant que l'énergie d'activation du constituant considéré se trouve augmentée ou diminuée.

En ce qui concerne les interactions chimiques, on peut distinguer deux types d'actions.

Pour le système amidon-eau, on aurait :

— une action « secondaire », dans le cas d'une réaction d'un radical polyosidique avec les molécules ou les radicaux de l'eau ;
— une action « indirecte », dans le cas d'une réaction entre les radicaux de l'eau et une chaîne polyosidique neutre de l'amidon.

A l'aide de ces considérations, nous allons essayer d'interpréter l'évolution des différentes caractéristiques de l'amidon irradié, étudiées en fonction de sa teneur en eau entre 0,8 et 40 p. 100.

La constance du nombre de ruptures de chaînes de l'amidon irradié à des teneurs en eau situées entre 0,8 et 21 p. 100 indique clairement que les scissions de chaînes résultent d'une action directe des radiations ; cependant, des réactions « secondaires » entre les fragments obtenus et les radicaux ou molécules d'eau ne peuvent pas être exclues. A une hydratation de 40 p. 100 environ, la moitié des réactions de ruptures de chaînes ne se produisent plus : l'eau exerce un effet de « protection ». Le même effet est observé dans tout le domaine d'hydratation étudié, dans le cas de la formation des groupements carbonyles et acides ; la variation de l'effet étant d'autant plus marquée que l'hydratation est plus faible et suivant, en première approximation, l'évolution de la chaleur d'hydratation (SCHIERBAUM et TAUFEL, 1962).

Étant donné que la zone d'hydratation jusqu'à environ 10 p. 100 est caractérisée par l'existence de fortes liaisons hydrogène entre l'eau et l'amidon, il nous semble que l'effet de protection diminuant le nombre des réactions d'oxydation doit, en grande partie, être attribué à la présence de ces liaisons :

— d'une part, de l'énergie serait consommée dans la rupture des liaisons hydrogène ;
— d'autre part, un transfert d'énergie des unités glucose activées aux molécules d'eau serait possible par l'intermédiaire des liaisons existantes entre elles.

Dans la zone des plus fortes hydratations, on peut invoquer en outre, et plus spécialement pour les réactions de ruptures de chaînes, un effet protecteur de l'eau dû à l'augmentation de mobilité des constituants du milieu au fur et à mesure de l'hydratation ; cet accroissement de mobilité favoriserait la recombinaison des radicaux formés.

Le fait que, dans la zone d'hydratation allant jusqu'à 21 p. 100, le nombre de ruptures de chaînes apparaisse indépendant de la teneur en eau, nous permet d'admettre que ces réactions se produisent sur des points non « protégés » par des liaisons hydrogène. Or, il a été montré (GUILBOT et DRAPRON, 1950-1957), que l'atome d'oxygène de la liaison glucosidique n'intervient pratiquement pas dans la fixation des molécules d'eau.

Ne tenant compte que des forces des liaisons intramoléculaires, on pourrait prévoir que les réactions de ruptures de chaînes se produisent au niveau de la liaison glucosidique à une fréquence environ deux fois plus élevée qu'au niveau du cycle pyranique, étant donné que, dans ce dernier cas, deux liaisons doivent être rompues. Contrairement à cette probabilité statistique, nos résultats semblent ainsi nous habiliter à émettre l'hypothèse que, sous influence des liaisons hydrogène, les réactions de ruptures de chaîne se produisent en totalité au niveau de la liaison glucosidique.

L'évolution de la quantité de glucose libéré par irradiation de l'amidon en fonction de sa teneur en eau est particulièrement intéressante à suivre, La constance de la quantité de glucose libéré jusqu'à une teneur en eau d'au moins 9,2 p. 100 permet d'estimer que, dans cette zone, l'eau n'intervient pas dans la réaction de formation du glucose.

En effet, si les molécules d'eau intervenaient par action « secondaire » ou action « indirecte », on devrait s'attendre à un accroissement de la quantité de glucose formé en fonction de l'hydratation. Du fait que la formation du glucose par l'intermédiaire d'un radical n'est possible qu'à condition que les molécules ou les radicaux de l'eau interviennent, il nous semble justifié d'admettre que le glucose résulte d'une décomposition intramoléculaire d'un résidu glucose activé. Un tel mécanisme de réaction a été mis en évidence dans le cas de certains éthers (NEWTON, 1957). On aurait le schéma suivant :

$$R_1—O—CH_2—CH_2R_2 \rightarrow R_1—OH + CH_2 = CH—R_2$$

Au-delà de 9,2 p. 100 d'eau, la quantité de glucose libéré augmente et dans la zone de 15,7 à 21,2 p. 100 d'eau, elle atteint un nouveau palier dont la valeur est d'environ 50 p. 100 supérieure à celle de la première zone.

Comme le nombre de ruptures de chaîne reste identique, la formation du supplément de glucose dosé doit être attribuée à l'intervention de l'eau Les expériences effectuées ne permettent pas de préciser si l'évolution de la quantité de glucose formé entre les hydratations de 9,2 à 15,7 p. 100 est continue ou discontinue. Cependant, le fait que son augmentation ne se poursuit pas entre 15,7 et 21,2 p. 100 d'eau, indique que la fraction d'eau de sorption qui est intervenue présente des caractéristiques particulières. Il est intéressant de noter que, dans la même zone d'hydratation, la quantité de HMF formée diminue d'environ 50 p. 100 par rapport à celle de la première zone.

Dans le cas de l'amidon irradié à 40 p. 100 d'eau, la quantité de glucose formée étant environ 10 fois plus élevée pour un nombre de ruptures de chaînes deux fois

plus faible que pour les teneurs en eau précédentes, il convient d'admettre qu'il est libéré par action indirecte des radicaux de l'eau sur les macromolécules de l'amidon.

La teneur en eau limite correspondant à l'apparition de l'eau « libre » dans le système amidon-eau étant voisine de 33 p. 100, ces résultats montrent que l'action indirecte des radicaux d'eau sur l'amidon ne se produit qu'en présence d'eau ayant un degré de liberté voisin de celui de l'eau « libre ».

Concernant l'état de fixation de l'eau dans l'amidon, nos conclusions peuvent être résumées comme suit :

Interprété sur la base d'un transfert d'énergie par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, l'effet de protection, constaté dans le cas des réactions d'oxydation, semble mettre en évidence une gamme continue et décroissante de forces de fixation de l'eau. Par contre, l'évolution par palier de la quantité de glucose formée indique la présence dans l'amidon hydraté d'états spécifiques de l'eau dont les points de transitions correspondent en première approximation à ceux trouvés par plusieurs méthodes d'investigation de l'état de l'eau : environ 10 p. 100 et environ 33 p. 100.

Il paraît ainsi que l'effet de protection, d'autant plus marqué que les liaisons hydrogène sont plus fortes, ne permet pas de distinguer les différents états de l'eau dans l'amidon, mis en évidence par l'évolution de la libération du glucose, qui, contrairement à l'effet de protection, se manifeste en fonction de la mobilité croissante de l'eau dans l'amidon.

4. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'action des radiations gamma sur l'amidon conduit à une dégradation des chaînes polyosidiques, avec, en particulier, formation de produits d'oxydation et de déshydratation.

La présence de l'eau se manifeste, dans différentes réactions étudiées, comme suit :

1° Le nombre des réactions d'oxydation diminue ;

2° Le nombre de ruptures de chaîne reste constant jusqu'à une teneur en eau d'environ 21 p. 100 pour diminuer à partir d'une teneur en eau située entre 21 et 40 p. 100.

3° La quantité de glucose libéré augmente à partir d'une teneur en eau d'environ 9 p. 100.

On met en évidence :

— un effet de protection de l'eau sur l'amidon, dans le cas des réactions d'oxydation et des réactions de ruptures de chaînes ;

— une intervention chimique, dans le cas de la formation du glucose.

Les effets de protection ont été expliqués en admettant deux causes :

— un transfert d'énergie des unités glucose activées aux molécules d'eau se produisant par l'intermédiaire des liaisons hydrogène ;

— la recombinaison des fragments, favorisée par leur mobilité.

Le premier mode d'intervention de l'eau serait prédominant dans le cas des réactions d'oxydation, l'effet étant particulièrement marqué dans la zone des très faibles hydratations et évoluant en première approximation, parallèlement à la chaleur

d'hydratation. Par contre, la recombinaison de fragments ne deviendrait manifeste qu'à partir d'une teneur en eau supérieure à 21 p. 100. Une conséquence de ces hypothèses est que les réactions de ruptures de chaînes se produisent au niveau des points non « protégés » par des liaisons hydrogène, tels que l'oxygène de la liaison glucosidique.

La libération du glucose en fonction de la teneur en eau de l'amidon suit une courbe par paliers, les zones de transition se situant entre 5 et 15 p. 100 et entre 21 et 40 p. 100. Cette évolution permet de penser que, dans l'amidon, il existe des fractions d'eau ayant une mobilité déterminée. Les zones de transition ainsi mises en évidence sont à rapprocher des points singuliers obtenus par plusieurs méthodes d'investigation de l'état de fixation de l'eau dans l'amidon : à savoir 10 et 33 p. 100, le dernier point marquant l'apparition de l'eau « libre ».

La formation du glucose à des teneurs en eau aussi basses que 0,8 p. 100, ainsi que la présence de l'hydroxyméthylfurfural, suggèrent que des scissions hydrolytiques se produisent par voie de réactions d'élimination intramoléculaires.

Les modifications induites dans les unités glucose comprennent, entre autres, la formation d'unités arabinose et xylose, ainsi que d'un résidu (produit X) dont la structure doit être voisine de celle du glucose.

SUMMARY

IONIZING RADIATIONS ACTION ON STARCH :
GAMMA RADIATIONS EFFECTS, AT THE DOSE OF 30 MR,
ON POTATO STARCH, AS A FUNCTION OF ITS WATER CONTENT

Gamma radiations action, at the dose of 30 MR, on potato starch, as a function of its water content, has been studied by observing particularly the polyosidic chains degradation and the formation of several oxydation and dehydration products. Glucose formation in dry starch, as well as the presence of hydroxymethylfurfural imply that hydrolytic splitting takesplace through intramolecular elimination reacting.

Water has been found to interfere with starch radiolytic reactions in three ways :

— a protecting effect as regards oxydation reactions, all the more important as hydration is lower, wich may be due to energy transferring from activated glucose units to water molecules, through hydrogen bounds.

— a protecting effect as regards chain splitting reactions, showing itself only for water contents higher than 21 p. 100 and possibly resulting from a greater mobility of chain pieces which would help their combining again with one another.

— a chemical interference in glucose formation the quantity of which increases by degrees as a function of hydration, with intermediate stages corresponding fairly to the singular points shown off in the bound state of water in starch, that is 10 and 33 p. 100.

It appears thus that the study of radiolytic reaction of hydrated starch allows to get information on its supramolecular structure.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BADENHUIZEN N. P., 1958. Structure, properties and growth of starch granules. In : *Handbuch für Pflanzenphysiologie*, vol. IV, 137-153-Springer Verlag, Berlin.

BOURNE E. J., STACEY M. and VAUGHAN G., 1956. Action of X rays on dilute aqueous amylose solution. *Chem. and Ind.*, 573-4.

CHAMPETIER G. et YOVANOVITCH O., 1952. Sur l'hydratation de l'amidon. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, 837.

CHARLESBY A., 1955. The degradation of cellulose by ionizing radiation. *J. Polym. Sci.*, **15**, 263-70.

CHARLESBY A., 1960. *Atomic Radiation and polymers*, Pergamon Press.

COURTOIS E. et GUERNET A., 1957. Recherches sur l'oxydation partielle des polyols acycliques par l'acide periodique. *Bull. Soc. Chim.*, 1388.

DEROSIER N. W. et ROSENSTOCK H. N., 1960. *Radiation Technology in Food, Agriculture, and Biology*, The Avi Publishing Company, Inc.

DEDONDER R., 1960. In : *Monographie de Chimie Organique*, vol II, **31**, Masson et Cie.

DRAPRON R., 1961. *Chromatographie sur papier avec gradient d'évaporation de la phase mobile.* — Communication à la section de Chimie analytique de la Soc. chim. de France (janvier).

EHRENBERG L., JAARMA M. and ZIMMER, E. C., 1957. The influence of water content on the action of ionizing radiation on starch. *Acta Chem. Scand.*, **11**, 950-56.

GREENWOOD C. T., 1956. Aspects of the physical chemistry of starch. In : *Advances in Carbohydrate Chemistry*, vol. **11**, 336-393, Academic Press Inc., Publishers, New York, N. Y.

GUILBOT A., CHARBONNIÈRE R., ABADIE P. et GIRARD P., 1960. L'eau de sorption de l'amidon : Étude par spectrologie hertzienne. *Die Stärke*, **12**, 327-332.

GUILBOT A., CHARBONNIÈRE R. et DRAPON R., 1961. Sur la contribution de l'eau à l'organisation des chaînes macromoléculaires de l'amidon. *Die Stärke*, **13**, 12204-207.

GUILBOT A. et DRAPON R., 1950-57. Travaux inédits.

GUILBOT A. et LEVAVASSEUR G., 1959. Structure submicroscopique de l'amidon : examen des grains en coupes minces au microscope électronique, *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 2626.

HAISSINSKI M., 1957. *La chimie nucléaire et ses applications*. Masson et Cie.

HAWORT J., 1944. *J. Chem. Soc.*, 667.

HOLLO J. et SZEITLI J., 1961. Studien zur Hydrolyse der Stärke. *Die Stärke*, **13**, 32-38 et 327-331.

HUGETT A. S. et NIXON D. A., 1957. Enzymic Determination of Blood Glucose. *Biochem. J.*, **66**, 12 P.

KEILLIN D. and HARTREE E. F., 1952. Specificity of Glucose Oxidase. *Biochem. J.*, **50** 331.

KERTESZ Z. I., SCHULZ E. R., FOX G. et GIBSON M., 1958. Effects of ionizing radiations on plant tissues. Part. IV. Some effects of X radiations on starch and starch fractions. *Food Research*, **24**, 609-17.

KOROTCHENKO K. A. et ORESHKO U. F., 1959. Mechanism of the action of ionizing radiation on starch. *Izvest. Uyssh. Ucheb. Zowed. Pishch. Techn.*, **5**, 29-34, in : Chem. Abst., **54**, 9 139 *b* (1960).

KOROTCHENKO K. A. et ORESHKO U. F., 1960. Research on the destruction of starch under the influence of gamma radiation. *Dokl. Akad. Nauk.*, **133**, 1219-22. (Trad. angl.).

KUHN W., 1930. Uber die Kinetik des Abbaues hochmolekularer Ketten. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, **63**, 1503.

LAUNER H. F. et TOMIATSU Y., 1959. Stoichiometry of Chlorite-Aldehyde Reactions. *Anal. Chem.*, 1385.

LAUNER H. F. et TOMIATSU Y., 1961. Failure of alkaline methods to measure the degree of polymerisation of starch and polyglucosides. *Anal. Chem.*, **33**, 79-82.

LEFORT M., 1959. *Les radiations nucléaires*. Presses Universitaires de France.

LEGRAND CH. et YOVANOVITCH O., 1957. Étude radio-cristallographique de l'influence de l'eau sur la structure de divers amidons. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 1553.

LINDBERG B. et THEANDER. O., 1954. Quantitative Determination of Carbonyl Groups in Oxycellulose by Means of Sodium Borohydride. *Svensk, Papperst.*, **57**, 83.

LOEWUS F. A., 1952. Improvement in Anthrone Method for Determination of Carbohydrates. *Anal. Chem.*, **24**, 219.

NEWTON A. S., 1957. A survey of the radiation chemistry of some aliphatic ethers. *J. Phys. Chem.*, **61**, 1485-90.

NIKUNI Z. and MISHINA A., 1960. The effects of gamma-rays on potato-starch. *Mem. Inst. Sci. Industr. Res., Osaka Univ.*, **17**, 215-18.

RADLEY J. A., 1960. The effects of irradiation by high energy cathods rays on starch. *Die Stärke*, **12**, 201-3.

SAEMANN J. F., MILLET M. A., 1952. Effect of high-energy cathode rays on Cellulose. *Ind. and Eng. Chemistry*, **44**, 2848-52.

SAMEC M., 1959. Uber lösliche Stärken, erhalten durch gamma-Strahlung. *Die Stärke*, **10**, 285.

SAMEC M., 1960. Veränderung der Stärke unter dem Einfluss ionisierender Strahlen. *Die Stärke*, **12**, 99.

SCHIERBAUM F. une TAUFEL L., 1962. Hydratation der Stärke. IV. Die Abhängigkeit der der Sorptionwärme der Stärke von ihrer Hydratation. *Die Stärke*, **14**, 233-8.

ULLMANN N., 1958. Das Wasser des Stärkekornes. *Kolloidchemie makromolekularer Naturstoffe*, **18**, 81-91.

WHELAN W. J., 1958. Starch and similar polysaccharides. In : *Handbuch für Pflanzenphysiologie*, vol. **4**, 154-240, Springer Verlag, Berlin.

WOLFROM M. L., MC CABE L. J., MICHELAKIS A. M., BINKLEY W. W., 1962. The effects of ionizing radiations on polysaccharides ; irradiation of starch and inulin. « *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* ».

YOVANOVITCH O., 1957. Sur l'hydratation de l'amidon de pomme de terre. *C. R. Acad. Sci.*, **240**, 426.

ZOBEL H. F., et SENTI R. F., 1960. *The degree of cristallinity of starch granules as measured by X-rays diffraction.* Communication présentée au 45e Congrès de l'A. A. C. C. (mai).

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1964